

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
21. November 2002 (21.11.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/093519 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **G07K**
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/05227
(22) Internationales Anmeldedatum:
13. Mai 2002 (13.05.2002)
(25) Einreichungssprache: Deutsch
(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
(30) Angaben zur Priorität:
101 23 041.9 11. Mai 2001 (11.05.2001) DE
(71) Anmelder und
(72) Erfinder: **HEINTGES, Tobias** [DE/DE]; Warendorfer
Str. 5, 40468 Düsseldorf (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): **TESSMANN, Kathi** [DE/DE]; Otto-Hahn-Str. 147, 40597 Düsseldorf (DE). **HÄUSSLINGER, Dieter** [DE/DE]; Hauptstr. 19, 40597 Düsseldorf (DE). **ARTSAENKO, Olga** [RU/DE]; Olympiasiegerstr. 1, 41427 Neuss (DE).
(74) Anwälte: **HELBING, Jörg** usw.; Von Kreisler Selting Werner, Postfach 10 22 41, 50462 Köln (DE).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) **Title:** HUMAN HIGH-AFFINITY ANTIBODY FRAGMENTS FOR ESSENTIAL PROTEINS OF THE HEPATITIS-C VIRUS

(54) **Bezeichnung:** HUMANE HOCHAFFINE ANTIKÖRPERFRAGMENTE GEGEN ESSENTIELLE PROTEINE VON HEPATITIS-C-VIRUS

(57) **Abstract:** The invention relates to human antibody fragments, which inhibit the multiplication of hepatitis-C virus and which comprise the variable regions of the light chain (VL) and of the heavy chain (VH) of antibodies against one or several essential proteins of the hepatitis-C virus. The invention further relates to the use of said antibody fragments for the treatment and diagnosis of hepatitis C, DNA sequences, coding for said antibody fragments and the use of said DNA sequences for vector constructs in the gene therapy of hepatitis-C.

(57) **Zusammenfassung:** Die vorliegende Anmeldung betrifft humane Antikörperfragmente, die die Vermehrung von Hepatitis-C-Virus hemmen und die die variablen Bereiche der leichten Kette (VL) und der schweren Kette (VH) von Antikörpern gegen ein oder mehrere essentielle Proteine von Hepatitis-C-Virus umfassen. Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung der Antikörperfragmente zur Behandlung und Diagnose von Hepatitis C, DNA-Sequenzen, die für diese Antikörperfragmente kodieren sowie die Verwendung dieser DNA-Sequenzen in Vektorkonstrukten zur Gentherapie von Hepatitis C.



WO 02/093519 A2

Humane hochaffine Antikörperfragmente gegen essentielle Proteine von Hepatitis-C-Virus

Die vorliegende Anmeldung betrifft humane Antikörperfragmente, die die Vermehrung von Hepatitis-C-Virus hemmen und die die variablen Bereiche der leichten Kette (V_L) und der schweren Kette (V_H) von Antikörpern gegen ein oder mehrere essentielle Proteine von Hepatitis-C-Virus umfassen. Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung der Antikörperfragmente zur Behandlung und Diagnose von Hepatitis C, DNA-Sequenzen, die für diese Antikörperfragmente kodieren sowie die Verwendung dieser DNA-Sequenzen in Vektorkonstrukten zur Gentherapie von Hepatitis C.

Hintergrund der Erfindung

Die Behandlung von Hepatitis C ist eine der momentan größten Herausforderungen der pharmazeutischen Forschung. Zwar sind Antikörper bekannt, die an Hepatitis-C-Virus(HCV)-Antigene binden (so z. B. aus WO 93/04084 und WO 00/05266), diese Antikörper besitzen jedoch keine hinreichend große Bindungsaffinität, um die Vermehrung der HCV *in vivo* zu hemmen. Darüber hinaus handelt es sich um murine, d.h. nicht-humane Antikörper, und es sind vollständige, intakte Antikörper, die aufgrund ihrer Disulfidbrücken instabil bei den im Zytoplasma herrschenden reduzierenden Bedingungen sind. Diese Antikörper sind daher für gentherapeutische Zwecke am Menschen ungeeignet.

HCV hat ein (+)-strängiges RNA-Genom, das für ein einziges Polyprotein mit etwa 3000 Aminosäuren codiert. Dieses einzige Polyprotein wird durch Proteasen des Wirtes oder des Virus co- oder posttranslational in funktionelle virale Proteine gespalten (Grakoui A. et al., J. Virol., 67:1385-95 (1993); Bartenschlager R. et al., J. Virol., 68:5045-55 (1994); Hijikata M. et al. Proc. Natl. Acad. Sci., 90:10773-7 (1993)). Zu den vermuteten strukturellen Proteinen gehören das Kernprotein (C) und zwei Hüllproteine (E1 und E2), während die nichtstrukturellen Proteine (NS2, NS3, NS4, NS5) vermutlich Komponenten eines Komplexes sind, der für die virale RNA-Replikation verantwortlich ist (Bartenschlager R. et

- 2 -

al., J. Virol., 68:5045-55 (1994); Suzich J. A. et al., J. Virol., 67: 6152-8 (1993); Steinkuhler C. et al., J. Virol., 70:6694-700 (1996); Tomei L. et al., J. Virol., 67:4017-26 (1993)).

Das HCV-NS3-Protein (s. SEQ ID NO:18) ist ein bifunktionelles Enzym, das Protease-Aktivität im N-terminalen Drittel und RNA-Helicase-Aktivität in der C-terminalen Position aufweist (Bartenschlager R. et al., J. Virol., 68:5045-55 (1994); Tomei L. et al., J. Virol., 67:4017-26 (1993)). Es wurde berichtet, dass HCV-NS3 wahrscheinlich durch zelluläre Proteasen prozessiert wird (Shoji I. et al., Virology, 254:315-23 (1999)). Die Protease- und die Helicase-Domäne von NS3 sind in vitro in Abwesenheit der jeweils anderen Domäne aktiv (Wardell A. D. et al., J. Gen. Virol., 80:701-9 (1999); Kim D. W. et al., J. Virol., 71:9400-9 (1997); Kolykhalov A. A. et al., J. Virol., 68:7525-33 (1994)). NS3-Protease gehört zur Serin-Protease-Familie und ist für die Prozessierung des HCV-Polyproteins an den Verknüpfungsstellen NS3/NS4A (cis-Spaltung), NS4A/NS4B, NS4B/NS5A und NS5A/NS5B (trans-Spaltung) verantwortlich (Tomei L. et al., J. Virol., 67:4017-26 (1993); Hahm B. et al., J. Virol., 69:2534-9 (1995); Bartenschlager R. et al., J. Virol., 68:5045-55 (1994); Bartenschlager R. et al., J. Virol., 67:3835-44 (1993); Tomei L. et al., J. Virol., 67:4017-26 (1993)). Die enzymatische Aktivität der NS3-Protease hängt zum Teil von der Komplexbildung mit NS4A ab (Hahm B. et al., J. Virol., 69:2534-9 (1995); Failla C. et al., J. Virol., 68:3753-60 (1994); Bartenschlager R. et al., J. Virol., 69:7519-28 (1995); Koch J. O. et al., Virology, 221:54-66 (1996); Lin C., Rice C. M., Proc. Natl. Acad. Sci. 92:7622-6 (1995)).

Die Struktur der NS3-Protease zeigt eine flache Substratbindungstasche, was es schwierig macht, effektive Protease-Inhibitoren zu entwerfen (Kim J. L. et al., Cell, 87:343-55 (1996); Yan Y. et al., Protein Sci. 7:837-47 (1998)). Die Helicase-Aktivität besteht aus einer Polynucleotid-stimulierten NTPase-Aktivität, einer 3'→5'-Entspiralisierungsaktivität und einer Bindungsaktivität für einzelsträngige Nucleotide (Wardell A. D. et al., J. Gen. Virol., 80:701-9 (1999); Gwack Y. et al., Eur. J. Biochem., 250:47-54 (1997); Preugschat F. et al., J. Biol. Chem., 271:24449-57 (1996)). Die Kristallstruktur von NS3-Helicase wurde beschrieben (Yao N. et al., Nat. Struct. Biol., 4:463-7 (1997); Cho H. S. et al., J.

- 3 -

Biol. Chem., 273:15045-52 (1998); Kim J. L. et al., Structure, 6:89-100 (1998)). Die Helicase-Aktivität scheint notwendig zu sein, um die einzelsträngige RNA während der Duplikation des viralen Genoms zu entspiralisieren (Wardell A. D. et al., J. Gen. Virol., 80:701-9 (1999); Gwack Y. et al., Eur. J. Biochem., 250:47-54 (1997)). Daher ist HCV-NS3-Helicase ein vielversprechender antiviraler Angriffspunkt, der für die virale Replikation essentiell ist.

Einzelkettige variable Fragmente (sFv) von Antikörpern enthalten variable Domänen der schweren (V_H) und der leichten Kette (V_L), die durch einen Polypeptidlinker miteinander verbunden sind, der sie zu einer voll funktionellen antigenspezifischen Bindungseinheit macht (Marasco W. A., Gene Ther., 4:11-5 (1997; Chen S. Y. et al., Hum. Gene Ther., 5:595-601 (1994)). Beide variablen Domänen werden auf einer Proteinkette exprimiert, was die sFv-Fragmente stabil gegenüber der reduzierenden Umgebung macht, die man im Cytoplasma findet. Die intrazellulären sFv können direkt innerhalb von Zellen exprimiert werden, wodurch ein aktives Molekül für die Gentherapie auf Proteinbasis entsteht. Die Expression von Human-sFv sollte die Immunreaktion gegen das fremde Transgen minimieren (Marasco W. A., Gene Ther., 4:11-5 (1997; Chen S. Y. et al., Hum. Gene Ther., 5:595-601 (1994); Rader C., Barbas Cr., Curr. Opin. Biotechnol., 8:503-8 (1997)).

Es ist im Stand der Technik bekannt, dass die intrazelluläre Expression von sFv-Fragmenten als "Intrakörper" verschiedene intrazelluläre Proteine wirksam hemmen kann. So zeigt die intrazelluläre Expression von Anti-tat-Intrakörpern nach der retroviralen Transduktion eine Hemmung der HIV-Replikation (Marasco W. A. et al., J. Immunol. Methods, 231:223-38 (1999); Mhashilkar A. M. et al., Hum. Gene Ther., 10:1453-67 (1999); Poznansky M. C. et al., Hum Gene Ther., 9:487-96 (1998)). Die Hemmung der HIV-Integrase durch sFv-Intrakörper führte zur Resistenz kultivierter Zellen gegen HIV-Infektion (Kitamura Y. et al., 20:105-14 (1999)). Diese konnte auch nach der retroviralen Transduktion von Zellen mit einem sFv-exprimierenden Vektor beobachtet werden (Bouhamdan M. et al., Gene Ther., 6:660-6 (1999)). Der phänotypische Knock-out von Interleukin-2-Rezeptoren wurde durch Transduktion primärer T-Zellen mit einem lentiviralen Vektor erreicht, der IL-2-Rezeptor-bindende sFv-Fragmente im ER exprimierte

- 4 -

(Richardson J. H. et al., Gene Ther., 5:635-44 (1998)). Die Hemmung von CREB und des aktivierenden Transkriptionsfaktors 1 (ATF-1) reduzierte das Malignitätspotential von Melanomzellen erheblich (Jean D. et al., Oncogene, 19:2721-30 (2000)). Die Hemmung des Oncogens erB-2 durch adenovirale Vektoren, die Anti-erB-2-sFv exprimieren, führte zur Rückbildung des malignen Phänotyps von Eierstocktumorzellen (Deshane J. et al., J. Clin. Invest., 96:2980-9 (1995)).

Darüber hinaus werden klinischen Studien mit Patientinnen, die unter Eierstockkrebs leiden, durchgeführt. Dabei werden adenovirale Vektoren verwendet, um Anti-erB-2-Intrakörper zu exprimieren (Deshane J. et al., J. Clin. Invest., 96:2980-9 (1995)). Andere Gruppen verwenden einen retroviralen MuLV-Vektor, um Anti-gp120-Intrakörper in T-Helferzellen bei HIV-infizierten Patienten zu exprimieren (Marasco W. A. et al., J. Immunol. Methods, 231:223-38 (1999); Chen S. Y. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:5932-6 (1994)).

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung bestand darin, spezielle Antikörperderivate bereitzustellen, die die Vermehrung von Hepatitis C wirksam hemmen und die intrazellulär eingesetzt werden können, sodass sie für gentherapeutische Anwendungen geeignet sind. Es wurde gefunden, dass spezielle einzelkettige Antikörperfragmente gegen essentielle Proteine von Hepatitis-C-Virus (HCV), insbesondere hochaffine humane einzelkettige (sFv) Antikörperfragmente gegen HCV-NS3, die aus einer großen Bibliothek von rekombinanten Antikörperfragmente selektiert wurden, diese Anforderungen erfüllen. Es konnte gezeigt werden, dass einige der erfindungsgemäßen Antikörperfragmente eine annähernd 100%ige Hemmung der HCV-Helikaseaktivität bewirken.

Zusammenfassung der Erfindung

Die vorliegende Erfindung betrifft somit

(1) ein einzelkettiges Fragment von einem humanen Antikörper, das die Vermehrung von Hepatitis-C-Virus (nachfolgend auch kurz "HCV") hemmt und das die variablen Bereiche der leichten Kette (V_L) und der schweren Kette (V_H) eines Antikörpers gegen ein oder mehrere essentielle Proteine von HCV umfasst;

- 5 -

- (2) in einer bevorzugten Ausführungsform von (1) hemmt das einzelkettige Fragment ein HCV-NS3-Protein, insbesondere NS3-Protease und/oder NS3-Helicase, besonders bevorzugt NS3-Helicase;
- (3) eine DNA-Sequenz, die für ein Antikörperfragment gemäß (1) oder (2) kodiert;
- (4) einen Vektor oder Gentransfervektor, umfassend eine DNA-Sequenz gemäß (3);
- (5) ein Verfahren zur Identifizierung von Antikörperfragmenten, die die Vermehrung von HCV hemmen, gemäß (1) oder (2), umfassend
 - a) Klonierung einer DNA-Bibliothek, die Antikörperfragmente gegen ein oder mehrere essentielle Proteine von HCV kodiert;
 - b) Expression genannter Antikörperfragmente auf der Oberfläche von Bakteriophagen mit anschließender Anreicherung der Phagen, die Antikörperfragmente mit hoher Affinität für das essentielle Protein tragen, durch mehrere Zyklen der Selektion und Reamplifikation (Panning); und gegebenenfalls weiterhin
 - c) Vermehrung genannter Antikörperfragmente mit hoher Affinität durch lösliche Expression in Bakterienzellen und Isolierung der Antikörperfragmente aus dem Periplasma dieser Zellen;
- (6) eine Wirtszelle, insbesondere eine prokaryontische Wirtszelle, die mit einem Vektor gemäß (4) transformiert ist und/oder eine DNA-Sequenz gemäß (3) enthält;
- (7) ein Verfahren zur Herstellung eines Antikörperfragments gemäß (1) oder (2), umfassend das Kultivieren einer Wirtszelle gemäß (6);
- (8) eine pharmazeutische oder diagnostische Zusammensetzung, die einen oder mehrere Antikörperfragmente gemäß (1) oder (2) enthält;
- (9) die Verwendung der Antikörperfragmente gemäß (1) oder (2) zur Herstellung einer Vakzine, insbesondere einer Vakzine zur passiven Immunisierung;
- (10) eine pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend einen oder mehrere Gentransfervektoren gemäß (4);
- (11) die Verwendung des Gentransfervektors gemäß (4) zur Herstellung eines Medikaments zur Gentherapie, insbesondere zur Gentherapie von HCV-Infektionen beim Menschen;

- 6 -

(12) ein Gentherapieverfahren, insbesondere ein Verfahren zur Behandlung von HCV-Infektionen, umfassend das Verabreichen des Gentransfervektors gemäß (4) an einen Patienten; und

(13) ein Vakzinierungsverfahren umfassend das Verabreichen eines Antikörperfragments nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 9 an den zu vakzinierenden Patienten..

Kurzbeschreibung der Figuren

Figur 1 zeigt die Serumantikörpertiter von 4 Patienten mit chronischer HCV-Infektion gegen rekombinantes NS3-Protein, die durch EIA bestimmt wurden.

Figur 2 zeigt die Ergebnisse einer Gel-Elektrophorese von sFv-cDNA-Fragmenten, die durch immunglobulinspezifische PCR erzeugt wurden.

Figur 3 zeigt die Anreicherung von Phagen mit sFv-Fragmenten, die Bindungsaffinität gegen rekombinantes NS3 zeigen, während verschiedener Durchgänge der Affinitätsselektion (Panning).

Figur 4 zeigt die Identifikation von monoklonalen Phagen, die sFv mit Bindungsaktivität gegen NS3-Protein tragen, durch Phagen-EIA.

Figur 5 zeigt EIA von gereinigten löslichen sFv-Fragmenten gegen NS3.

Figur 6 zeigt die Immunoblot-Analyse von bakteriell exprimierten rekombinanten sFv-Fragmenten.

Figur 7 zeigt die Aminosäuresequenz der variablen Bereiche der H- und L-Kette der in Experiment 1 selektierten humanen sFv.

Figur 8 zeigt die Aktivität bakteriell exprimierter sFv (Experiment 1), die durch Ni-NTA-Säulen bis zur Homogenität gereinigt wurden, im Kompetitions-EIA.

Figur 9 zeigt die Aminosäuresequenz der variablen Bereiche der H- und L-Kette der in Experiment 2 selektierten humanen sFv.

Figur 10 zeigt das Ergebnis der Herstellung von rekombinanter HCV Helikase, nämlich den Nachweis der Helikaseexpression durch Western blot (A) und das Ergebnis der Reinigung von His-tag-Helikase Mittels Ni-NTA-Agarose.

Figur 11 zeigt den Einfluss der Bindung des Antikörpers sFv1-2 auf die HCV-Helikaseaktivität (A), die Hemmung der HCV-Helikaseaktivität durch diesen Antikörper (B) und die Konzentrationsabhängigkeit dieser Hemmung (C).

Figur 12 zeigt den Einfluss der Bindung der Antikörper aus Experiment 2 auf die HCV-Helikaseaktivität.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

Das einzelkettige Fragment von einem humanem Antikörper gemäß Ausführungsform (1) der Erfindung (nachfolgend auch kurz "Antikörperfragment") hemmt vorzugsweise wenigstens ein essentielles Protein des HCV, kann jedoch auch mehrere hemmen. Vorzugsweise weist das Antikörperfragment eine Affinität $K_D \leq 10^{-6}$ M und besonders bevorzugt $\leq 10^{-7}$ M (bestimmt durch ein Kompetitions-ELISA wie z.B. unter "Materialien und Methoden" beschrieben) für wenigstens ein essentielles Virusprotein auf. "Essentielle Virusproteine" im Sinne der vorliegenden Erfindung umfassen dabei Oberflächenproteine (Envelope), Strukturproteine (Core) und Nichtstrukturproteine (NS) und sind vorzugsweise ausgewählt aus Envelope 1 (E1), Envelope 2 (E2), Core, NS3-Protease, NS3-Helicase, NS4A-Kofaktor, NS5B-RNA-Polymerase usw.

Gemäß Ausführungsform (2) hemmt das erfindungsgemäße Fragment NS3-Protease oder -Helicase, insbesondere NS3-Helicase. Dabei sind insbesondere solche Antikörperfragmente bevorzugt, in denen der variable Bereich der leichten Kette (V_L) eine oder mehrere der in Fig. 7A oder 9 gezeigten Sequenzen der komplementaritätsbestimmenden Regionen (CDR), nämlich eine oder mehrere der Sequenzen CDR-L1, CDR-L2 oder CDR-L3, aufweist und besonders bevorzugt eines der in SEQ ID NOs:1 bis 8 gezeigten Peptide oder ein Peptid mit Aminosäurenresten ("AS") 1 bis 109 von SEQ ID NO:52; AS 1 bis 109 von SEQ ID NO:53; AS 1 bis 115 von SEQ ID NO:54; AS 1 bis 117 von SEQ ID NO:55; AS 1 bis 117 von SEQ ID NO:56; AS 1 bis 117 von SEQ ID NO:57; oder AS 1 bis 116 von SEQ ID NO:58 oder ein Derivat derselben umfasst, und/oder in denen der variable Bereich der schweren Kette (V_H) eine oder mehrere der in Fig. 7B oder 9 gezeigten CDR-Sequenzen, nämlich eine oder mehrere der Sequenzen CDR-H1, CDR-H2 oder CDR-H3, aufweist und besonders bevorzugt eines der in SEQ ID NOs:9 bis 16 gezeigten Peptide oder ein Peptid mit AS 130 bis 254 von SEQ ID NO:52; AS 130 bis 257 von SEQ ID NO:53; AS 136 bis 262 von SEQ ID NO:54; AS 138 bis 261 von SEQ ID NO:55; AS 138 bis 262 von SEQ ID NO:56; AS 138 bis 261 von SEQ ID NO:57; AS 127 bis 249 von SEQ ID NO:58 oder ein Derivat derselben umfasst. "Derivate" im Sinne der vorliegenden Erfindung umfassen

- 8 -

dabei trunkierte Formen des jeweiligen Ausgangspeptids (C- und/oder N-terminal trunkiert), deletierte Formen des Ausgangspeptids (einzelne Aminosäurereste oder Sequenzabschnitte im Ausgangspeptid sind deletiert), substituierte Formen des Ausgangspeptids (einzelne Aminosäurereste oder Sequenzabschnitte im Ausgangspeptid sind durch andere Aminosäurereste oder Sequenzabschnitte ersetzt) und Kombinationen hiervon, wobei die Derivate im Wesentlichen (d.h. wenigstens 75 %, vorzugsweise wenigstens 90 %) die Aktivität (Hemmung, Inhibition) der Stammverbindung besitzen.

In dem Antikörperfragment gemäß Ausführungsform (1) und (2) der Erfindung ist es bevorzugt, dass die Fragmente V_L und V_H durch eine kovalente Bindung oder durch ein Linkermolekül, insbesondere durch ein Linkerpeptid miteinander verknüpft sind. Daneben ist auch eine Verknüpfung mittels non-proteinogener polymerer Verbindungen (wie z.B. Polycarbonate, Polyamide, Polyethylenglykolderivate, Polyaminderivate usw.) und niedermolekularer Verbindungen (wie Diamine usw.) möglich. Für einige Anwendungen des erfindungsgemäßen Antikörperfragments, in denen die Stabilität unter reduktiven Bedingungen nicht kritisch ist (so z.B. in der Diagnostik) können V_L und V_H auch durch eine Disulfidbrücke verknüpft sein. Besonders bevorzugt im Sinne der vorliegenden Erfindung ist es jedoch, dass V_L und V_H über ein Linkerpeptid, vorzugsweise über ein hydrophiles und flexibles Linkerpeptid, besonders bevorzugt über ein Peptid mit der Aminosäuresequenz $(Gly_aSer_b)_x$ (wobei a eine ganze Zahl von 1 bis 7, vorzugsweise von 2 bis 5 ist, b eine ganze Zahl von 1 bis 4, vorzugsweise 1 oder 2 ist und x eine ganze Zahl von 1 bis 10, vorzugsweise von 2 bis 7 ist) miteinander verknüpft sind. Dabei ist insbesondere ein Linkerpeptid mit der Aminosäuresequenz $(Gly_4Ser)_x$, wobei x die vorstehend angegebenen Werte aufweisen kann.

Die am meisten bevorzugten Antikörperfragmente im Sinne der vorliegenden Erfindung weisen eine der folgenden Peptidsequenzen oder ein Derivat derselben auf (wobei "Derivate" die vorstehend angegebene Bedeutung hat):

- (i) Peptid (SEQ ID NO:1)-(Gly₄Ser)_x-Peptid (SEQ ID NO:9)
- (ii) Peptid (SEQ ID NO:2)-(Gly₄Ser)_x-Peptid (SEQ ID NO:10)
- (iii) Peptid (SEQ ID NO:3)-(Gly₄Ser)_x-Peptid (SEQ ID NO:11)
- (iv) Peptid (SEQ ID NO:4)-(Gly₄Ser)_x-Peptid (SEQ ID NO:12)

- 9 -

- (v) Peptid (SEQ ID NO:5)-(Gly₄Ser)_x-Peptid (SEQ ID NO:13)
 - (vi) Peptid (SEQ ID NO:6)-(Gly₄Ser)_x-Peptid (SEQ ID NO:14)
 - (vii) Peptid (SEQ ID NO:7)-(Gly₄Ser)_x-Peptid (SEQ ID NO:15)
 - (viii) Peptid (SEQ ID NO:8)-(Gly₄Ser)_x-Peptid (SEQ ID NO:16),
 - (ix) Peptid (Aminosäurenreste ("AS") 1 bis 109 von SEQ ID NO:52)-(Gly₄Ser)_x-Peptid (AS 130 bis 254 von SEQ ID NO:52),
 - (x) Peptid (AS 1 bis 109 von SEQ ID NO:53)-(Gly₄Ser)_x-Peptid (AS 130 bis 257 von SEQ ID NO:53),
 - (xi) Peptid (AS 1 bis 115 von SEQ ID NO:54)-(Gly₄Ser)_x-Peptid (AS 136 bis 262 von SEQ ID NO:54),
 - (xii) Peptid (AS 1 bis 117 von SEQ ID NO:55)-(Gly₄Ser)_x-Peptid (AS 138 bis 261 von SEQ ID NO:55),
 - (xiii) Peptid (AS 1 bis 117 von SEQ ID NO:56)-(Gly₄Ser)_x-Peptid (AS 138 bis 262 von SEQ ID NO:56),
 - (xiv) Peptid (AS 1 bis 117 von SEQ ID NO:57)-(Gly₄Ser)_x-Peptid (AS 138 bis 261 von SEQ ID NO:57),
 - (xv) Peptid (AS 1 bis 116 von SEQ ID NO:58)-(Gly₄Ser)_x-Peptid (AS 127 bis 249 von SEQ ID NO:58),
- wobei x 2, 3, 4 oder 5 ist.

Besonders bevorzugt sind dabei solche Antikörperfragment, die eine der oben genannten Peptidsequenzen (i) bis (xiv) mit x= 4 aufweisen oder die die Peptidsequenz (xv) mit x= 2 aufweist (d.h. die Peptidsequenzen (ix) bis (xv) den SEQ ID NOs:52 bis 58 entsprechen).

Besonders bevorzugte DNA-Sequenzen der Ausführungsform (3) der Erfindung sind die in SEQ ID NOs:59 bis 65 gezeigten.

Die vorstehend definierten Antikörperfragmente sind auf verschiedene Wege zugänglich. Da eine klassische chemische Synthese aufgrund der Größe der Antikörperfragmente nicht das Verfahren der Wahl ist, ist es bevorzugt, dass rekombinante Techniken (z.B. die Expression in Prokaryonten, insbesondere Expression in *E. coli*) zur Herstellung dieser Antikörperfragmente eingesetzt werden. Hierdurch wird eine hohe Homogenität des Antikörperproduktes erzielt. Für die Synthese von Verbindungen, die eine Verknüpfung mittels non-proteino-

- 10 -

gener polymerer Verbindungen oder niedermolekularer Verbindungen aufweisen, sind jedoch zusätzliche chemische Reaktionsschritte unumgänglich.

Das Herstellungsverfahren der erfindungsgemäßen Fragmente ist nachfolgend anhand der Fragmente gegen NS3-Helikase und -Protease näher erläutert.

Das nichtstrukturelle Protein 3 (NS3) von Hepatitis-C-Virus (HCV) (s. SEQ ID NO:18) zeigt Protease- und Helicase-Aktivität, die für den Lebenszyklus des HCV essentiell sind. Für die Isolation von Antikörperfragmenten, die NS3 auf der Proteinebene hemmen, wurde zunächst eine Klonierung von Antikörperfragmenten, die an NS3 binden, für eine stabile intrazelluläre Expression durchgeführt. Um eine Immunreaktion nach der intrazellulären Expression (intrazelluläre Immunisierung) zu verhindern, wurden Antikörperfragmente menschlicher Herkunft gewählt. Zum Isolieren von Human-sFv-Fragmenten gegen NS3 wurde ein Phagen-Display-System eingesetzt, das auf der Expression von sFv-Fragmenten auf der Oberfläche von filamentösen Phagen beruhte. Eine große Phagemid-Bibliothek mit 2×10^6 Vertretern wurde aus Plasmazellen von 5 Patienten kloniert, die mit HCV infiziert waren. Phagen, die Human-sFv-Fragmente mit Bindungsaktivität gegen NS3 exprimierten, wurden während der Affinitätsselektion in hohem Maße angereichert. Selektierte lösliche sFv-Antikörperfragmente, die in *E. coli* exprimiert wurden, zeigten eine hohe Affinität zu NS3-Protein, was durch Immunoblot nachgewiesen und in einem EIA gemessen wurde. K_D -Werte, die die Affinität von sFv zu NS3 beschreiben, wurden durch kompetitiven EIA gemessen und auf zwischen 10^{-6} und 10^{-7} M geschätzt. Antikörperfragmente konnten als vollständige Human-IgG-Antikörper umklontiert werden, wodurch *E. coli* als unbedenkliche und billige Quelle für rekombinante humane hochaffine Antikörper für diagnostische und therapeutische Zwecke verwendet werden kann.

K_D -Werte zwischen 10^{-6} und 10^{-7} M (d.h. $\leq 10^{-6}$ M) oder kleiner als 10^{-7} M bezüglich der Affinität von sFv zu NS3 im kompetitiven EIA bedeuten, dass die Antikörperfragmente Inhibitoraktivität gegen NS3-Protease/Helicase aufweisen. Der Einsatz von Vektoren, die eine für diese inhibierenden Antikörperfragmente codierenden cDNA enthalten, für die Transduktion in infizierte Zellen eröffnet

eine neue gentherapeutische Strategie für die intrazelluläre Immunisierung gegen chronische HCV-Infektion.

Die Phagen-Display-Technik ermöglicht eine Affinitätsselektion von Proteinen in mehreren Größenordnungen aus kombinatorischen Bibliotheken (Rader C., Barbas Cr., Curr. Opin. Biotechnol., 8:503-8 (1997); Gram H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:3576-80 (1992); Hoogenboom H. R., Winter G. J. Mol. Biol., 227:381-8 (1992); Winter G. et al., Annu. Rev. Immunol., 12:433-55 (1994)). Eine Bibliothek von Human-Antikörper-Fragmenten wurde durch Immunglobulin-spezifische PCR aus Plasmazellen von mit HCV infizierten Patienten kloniert. Antikörperfragmente werden durch Fusion mit einem kleineren Hüllprotein (Gen-III-Protein; gIIIp) an der Spitze der Phagen auf der Oberfläche von filamentösen Bakteriophagen exprimiert (Phagen-Display) (Marks J. D. et al., J. Mol. Biol., 222:581-97 (1991); Pope A. R. et al., New York: IRL Press, 1-40 (1996); McCafferty J. et al., Nature, 348:552-4 (1990)).

Anschließend können Phagen, die Antikörper mit hoher Affinität gegen das Ziel-Antigen tragen, in mehreren Cyclen der Selektion und Reamplifikation (Panning) dramatisch angereichert werden.

Eine intrazelluläre Expression von humanen monoklonalen Antikörperfragmenten in Patienten sollte nicht von einer Immunreaktion gegen das Transgen begleitet sein. Daher wurden humane monoklonale Antikörper gegen das essentielle HCV-Protein NS3 (s. SEQ ID NO:18) für eine mögliche Verwendung als Intrakörper für die intrazelluläre Immunisierung kloniert. Knochenmarkaspirate von mit HCV infizierten Patienten wurden verwendet, um die codierenden Bereiche von variablen Immunglobulin-domänen zu amplifizieren. Diese PCR-Produkte wurden verwendet, um eine große humane sFv-Phagemid-Bibliothek zu klonieren. Ein EIA gegen rekombinantes NS3 wurde verwendet, um hohe Serum-Antikörpertiter gegen NS3 zu gewährleisten. Unter Verwendung von Phagen-Display und mehreren Cyclen von Affinitätsselektion wurden Phagen selektiert, die hochaffine sFv-Fragmente gegen NS3 trugen. Monoklonale Phagen wurden isoliert und auf Bindungsaktivität gegen NS3 getestet. Die meisten Antikörper waren gegen NS3-Helicase und nicht gegen NS3-Protease gerichtet, wie es bereits beschrieben

- 12 -

wurde (Chen M. et al., *Hepatology*, 28:219-24 (1998)). Lösliche rekombinante sFv-Fragmente wurden exprimiert, gereinigt und wiederum auf ihre Fähigkeit zur Bindung an NS3-Protein getestet. Die codierende cDNA von bindenden sFv wurde isoliert und sequenziert. Die variablen Domänen von sechs sFv-Fragmenten wurden charakterisiert. Die Sequenz zeigte κ -leichte-Ketten und λ -leichte-Ketten. VDJ-Keimliniensegmente wurden identifiziert. Die Affinität von sFv-Fragmenten wurde durch kompetitiven EIA bestimmt. Die sFv-Fragmente zeigten die vorstehend beschriebene hohe Bindungsaffinitäten, die auf eine Hemmung der NS3-Protease/Helicase schließen lassen.

Nach der Klonierung der sFv-Fragmente, ist auch eine Klonierung von vollständigen humanen IgG-, IgA- oder IgM-Antikörpern möglich (Boel E. et al., *J. Immunol. Methods*, 239:153-66 (2000)). Die rekombinante Expression von vollständigen humanen Antikörpern ist einfach und billig im Vergleich zur Isolation von Antikörpern aus dem Serum von HCV-infizierten Patienten. Überdies besteht bei der Verwendung rekombinanter hochaffiner Antikörper keine Gefahr einer Infektion mit HCV oder anderen humanen Pathogenen. Diese Antikörper sind für diagnostische und therapeutische Zwecke einsetzbar.

So können die Antikörperfragmente gemäß Ausführungsform (8) der Erfindung Bestandteil von pharmazeutischen Zusammensetzungen (wie z.B. Vakzine u.ä.) und von diagnostischen Zusammensetzungen (auch "diagnostische Kits" genannt) sein. Neben den Antikörperfragmenten enthalten diese Zusammensetzungen noch übliche Zusatzstoffe, Hilfsmittel usw. In den diagnostischen Kits können die erfindungsgemäßen Antikörperfragmente z.B. in einem Zellkultursystem zur Bewertung der NS3-Proteasefunktion (Heintges T. et al., *J. Med. Virol.*, (2000)), in Assays zum Testen auf NS3-Helicasefunktion (Hsu C. C. et al., *Biocem. Biophys. Res. Commun.*, 253:594-9 (1998)) in einem Replikonsystem zur Bewertung der Funktion von nichtstrukturellen HCV-Proteinen (Lohmann V. et al., *Science*, 285:110-3 (1999)) usw. eingesetzt werden.

Gemäß Ausführungsform (4) betrifft die vorliegende Erfindung einen Gentransfervektor, der eine DNA-Sequenz, die für ein erfindungsgemäßes Antikörperfragment kodiert, umfasst. Dieser Gentransfervektor kann neben der genannten

- 13 -

DNA-Sequenz noch weitere funktionelle DNA-Sequenzen (wie z.B. Promotorsequenzen, Erkennungssequenzen, virale Sequenzen, Translokalisationssequenzen, Spleißdonor und -akzeptorsequenzen, usw.) enthalten. So muss, um antivirale Wirkungen in Hepatocyten zu erreichen, die codierende cDNA für Antikörperfragmente, die die HCV-Replikation hemmen, durch Vektoren transduziert werden. Die zur Zeit vielversprechendsten Vektoren für die Gentherapie der Leber sind Lentiviren oder "entbeinte" Adenoviren (Richardson J. H. et al., Gene Ther., 5:635-44 (1998); Naldini L. et al., Science, 272:263-7 (1996); Zufferey R. et al., Nat. Biotechnol., 15:871-5 (1997); Ferry N., Heard J. M., Hum. Gene Ther., 9:1975-81 (1998)). Eine effiziente Expression von Human-Antikörperfragmenten in Hepatocyten ist Voraussetzung für die intrazelluläre Immunisierung mit Intrakörpern, was als ein vielversprechender Ansatz für die Behandlung einer chronischen HCV-Infektion erachtet wird.

Die pharmazeutischen Zusammensetzungen, Vakzine und Medikamente gemäß Ausführungsformen (8), (9), (10) und (11) können neben den erfindungsgemäßen Antikörperfragmenten bzw. Gentransfervektoren noch weitere pharmakologisch geeignete Hilfs- und Trägerstoffe und Lösungsmittel enthalten. Die exakte Zusammensetzung und der Gehalt der Antikörperfragmente und Gentransfervektoren richtet sich dabei sowohl nach der gewählten Applikationsform als auch nach der Art und Schwere der Erkrankung usw. und wird vom Fachmann in geeigneter Weise eingestellt. Gleiches gilt für Ausführungsformen (12) und (13). Auch hier wird der behandelnde Arzt die exakte Dosierung und das Behandlungsschema bestimmen.

Die Sequenz und Struktur der erfindungsgemäßen Antikörperfragmente sind weiterhin hilfreich für das Design von Inhibitoren der NS3-Protease oder -Helicase in Form von kleinen Molekülen. Ausgehend von der Struktur der Antikörperfragmente werden niedermolekulare Verbindungen abgeleitet, die diese essentiellen viralen Proteine des HCV hemmen.

Die vorliegende Erfindung wird anhand der nachfolgend beschriebenen Experimente und der detaillierten Beschreibung der Figuren näher erläutert, die jedoch den Schutzzumfang der vorliegenden Anmeldung nicht einschränken.

Experimente

Materialien und Methoden

Patienten: Von fünf Patienten mit chronischer Hepatitis C wurde Knochenmarkaspirat gewonnen. Alle Patienten hatten eine serologisch dokumentierte HCV-Infektion (HCV-Antikörper positiv im enzyme-linked immunoassay der dritten Generation und Serum-HCV-RNA durch RT-PCR nachweisbar). Von allen Patienten wurde Knochenmarkaspirat während Prozeduren gewonnen, die aus verschiedenen medizinischen Gründen indiziert waren. Alle Patienten unterzeichneten eine schriftliche Einverständniserklärung für die Entnahme von weiteren 5 ml Aspirat und 10 ml Serum gemäß einer Begutachtung durch das lokale Ethikkomitee. Von 4 der 5 Patienten war Serum verfügbar.

HCV-NS3-ELISA: Eine ELISA-Platte (Nunc, Gibco BRL, Karlsruhe) wurde über Nacht bei 4 °C mit 0,5 µg NS3 in PBS beschichtet und dann 1 h lang bei RT mit 3% BSA/PBS blockiert. Patientenseren wurden 1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:8000 bzw. 1:16 000 verdünnt und dann in die Näpfe gegeben. Nach 1 h Inkubation bei RT wurde die Platte zehnmal mit TBST/0,1% Tween®-20 gewaschen. Anschließend wurde ein Konjugat von Alkalischer Phosphatase (AP) und Ziegen-Anti-Human-(Fab)₂-IgG (Boehringer, Mannheim) in einer Verdünnung von 1:5000 in jeden Napf gegeben, und es wurde 1 h lang inkubiert. Nach zehnmal Waschen wurde p-Nitrophenylphosphat (Sigma, Aldrich, Taufkirchen) hinzugefügt, und es wurde 20 min lang inkubiert. Anschließend wurde die optische Dichte bei 405 nm unter Verwendung eines EIA Reader (Anthos Labtec, Salzburg, Österreich) gemessen. Ein Signal-Rausch-Verhältnis von über 2,4 wurde als positiv angesehen.

Klonierung einer kombinatorischen Human-sFv-Bibliothek: Knochenmarkaspirat wurde verwendet, um Gesamt-RNA zu präparieren. RNA wurde unter Verwendung von Tri-reagent (Gibco BRL, Karlsruhe) extrahiert und unter Verwendung von Oligo(dT)-Primern (Gibco BRL, Karlsruhe) in cDNA transkribiert. Die V_H- und V_L-Gene wurden durch PCR getrennt mit V_H- und V_L-spezifischen Primern amplifiziert. Weiterhin wurde der reverse Primer von V_L durch Einbau eines Flag-

- 15 -

tag am 5'-Ende modifiziert (Knappik, Plückthun, 1994). Der V_H-Antisense-Primer und der V_L-Sense-Primer enthalten Sequenzen, die einen flexiblen Aminosäurelinker (Gly₄Ser)₄ codieren, der zwischen den variablen Domänen der schweren und der leichten Kette eingesetzt ist. Dies ermöglicht eine rekombinante Hybridisierung zwischen V_H- und V_L-Produkten bei der folgenden Overlap-PCR-Reaktion. Die Cyclusparameter waren wie folgt: 30 Cyclen, 94 °C 1 min, 57 °C 2 min, 72 °C 1 min. Für die Extension-Overlap-PCR wurden gelgereinigte V_H- und V_L-PCR-Fragmente (Größe ungefähr 300 bp) in äquimolaren Verhältnissen miteinander gemischt und zur Bildung einer Matrize in Abwesenheit von Primern verwendet (2x: 92 °C 1 min, 63 °C 30 s, 58 °C 50 s, 72 °C 1 min). Anschließend wurden fünf Cyclen (92 °C 1 min, 63 °C 30 s, 58 °C 50 s, 72 °C 1 min) und 23 Cyclen (92 °C 1 min, 63 °C min, 72 °C 1 min) in Anwesenheit von spezifischen äußeren sFv-Primern, die SfiI-Restriktionsstellen am 5'-Ende enthielten, durchgeführt. Die verwendeten Primer waren:

Lambda-(λ)-Sense-Primer:

HuVλ1back 5' GCC ATG GCG GAC TAC AAA GAC CAG TCT GTG TTG ACG CAG CCG CC 3' (SEQ ID NO:19),

HuVλ2back 5' GCC ATG GCG GAC TAC AAA GAC CAG TCT GCC CTG ACT CAG CCT GC 3' (SEQ ID NO:20),

HuVλ3aback 5' GCC ATG GCG GAC TAC AAA GAC TCC TAT GTG CTG ACT CAG CCA CC 3' (SEQ ID NO:21),

HuVλ3back 5' GCC ATG GCG GAC TAC AAA GAC TCT TCT GAG CTG ACT CAG GAC CC 3' (SEQ ID NO:22),

HuVλ4back 5' GCC ATG GCG GAC TAC AAA GAC CAC GTT ATA CTG ACT CAA CCG CC 3' (SEQ ID NO:23),

HuVλ5back 5' GCC ATG GCG GAC TAC AAA GAC CAG GCT GTG CTC ACT CAG CCC TC 3' (SEQ ID NO:24),

HuVλ6back 5' GCC ATG GCG GAC TAC AAA GAC AAT TTT ATG CTG ACT CAG CCC CA 3' (SEQ ID NO:25).

Lambda-(λ)-Antisense-Primer:

- 16 -

HuJλ1for 5' GGA GCC GCC GCC GCC AGA ACC ACC ACC ACC AGA ACC ACC ACC
ACC ACC TAG GAC GGT GAC CTT GGT CCC 3' (SEQ ID NO:26),

HuJλ2-3for 5' GGA GCC GCC GCC GCC AGA ACC ACC ACC ACC AGA ACC ACC
ACC ACC TAG GAC GGT CAG CTT GGT CCC 3' (SEQ ID NO:27),

HuJλ4-5for 5' GGA GCC GCC GCC GCC AGA ACC ACC ACC ACC AGA ACC ACC
ACC ACC TAA AAC GGT GAG CTG GGT CCC 3' (SEQ ID NO:28).

Kappa-(κ)-Sense-Primer:

HuVκ1a back 5' GCC ATG GCG GAC TAC AAA GAC GAC ATC CAG ATG ACC CAG
TCT CC 3'(SEQ ID NO:29),

HuVκ2a back 5' GCC ATG GCG GAC TAC AAA GAC GAT GTT GTG ATG ACT CAG
TCT CC 3' (SEQ ID NO:30),

HuVκ3a back 5' GCC ATG GCG GAC TAC AAA GAC GAA ATT GTG ATG ACG CAG
TCT CC 3' (SEQ ID NO:31),

HuVκ4a back 5' GCC ATG GCG GAC TAC AAA GAC GAC ATC GTG TTG ACC CAG
TCT CC 3' (SEQ ID NO:32),

HuVκ5a back 5' GCC ATG GCG GAC TAC AAA GAC GAA ACG ACA CTC ACG CAG
TCT CC 3' (SEQ ID NO:33),

HuVκ6a back 5' GCC ATG GCG GAC TAC AAA GAC GAA ATT GTG CTG ACT CAG
TCT CC 3' (SEQ ID NO:34).

Kappa-(κ)-Antisense-Primer:

HuJκ1for 5' GGA GCC GCC GCC GCC AGA ACC ACC ACC ACC AGA ACC ACC ACC
ACC ACG TTT GAT TTC CAC CTT GGT CCC 3' (SEQ ID NO:35),

HuJκ2for 5' GGA GCC GCC GCC GCC AGA ACC ACC ACC ACC AGA ACC ACC ACC
ACC ACG TTT GAT CTC CAG CTT GGT CCC 3' (SEQ ID NO:36),

HuJκ3for 5' GGA GCC GCC GCC GCC AGA ACC ACC ACC ACC AGA ACC ACC ACC
ACC ACG TTT GAT ATC CAC TTT GGT CCC 3' (SEQ ID NO:37),

HuJκ4for 5' GGA GCC GCC GCC GCC AGA ACC ACC ACC ACC AGA ACC ACC ACC
ACC ACG TTT GAT CTC CAC CTT GGT CCC 3' (SEQ ID NO:38),

HuJκ5for 5' GGA GCC GCC GCC GCC AGA ACC ACC ACC ACC AGA ACC ACC ACC
ACC ACG TTT AAT CTC CAG TCG TGT CCC 3' (SEQ ID NO:39).

VH-Sense-Primer:

- 17 -

HuJH1a back 5' GGC GGC GGC GGC TCC GGT GGT GGT GGA TCC CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GG 3' (SEQ ID NO:40),

HuJH2a back 5' GGC GGC GGC GGC TCC GGT GGT GGT GGA TCC CAG GTC AAC TTA AGG GAG TCT GG 3' (SEQ ID NO:41),

HuJH3a back 5' GGC GGC GGC GGC TCC GGT GGT GGT GGA TCC GAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GG 3' (SEQ ID NO:42),

HuJH4a back 5' GGC GGC GGC GGC TCC GGT GGT GGT GGA TCC CAG GTG CAG CTG CAG GAG TCG GG 3' (SEQ ID NO:43),

HuJH5a back 5' GGC GGC GGC GGC TCC GGT GGT GGT GGA TCC GAG GTG CAG CTG TTG CAG TCT GC 3' (SEQ ID NO:44),

HuJH6a back 5' GGC GGC GGC GGC TCC GGT GGT GGT GGA TCC CAG GTA CAG CTG CAG CAG TCA GG 3' (SEQ ID NO:45).

VH-Antisense-Primer:

HuJH1-2for 5' GGA ATT CGG CCC CCG AGG CCG AGG AGA CGG TGA CCA GGG TGC C 3' (SEQ ID NO:46),

HuJH3for 5' GGA ATT CGG CCC CCG AGG CCG AAG AGA CGG TGA CCA TTG TCC C 3' (SEQ ID NO:47),

HuJH4-5for 5' GGA ATT CGG CCC CCG AGG CCG AGG AGA CGG TGA CCA GGG TTC C 3' (SEQ ID NO:48),

HuJH6for 5' GGA ATT CGG CCC CCG AGG CCG AGG AGA CGG TGA CCG TGG TCC C 3' (SEQ ID NO:49).

äußere sFv-Primer (pull through):

SC forward: 5' GGA ATT CGG CCC CCG AG 3' (SEQ ID NO:50),

SC back: 5' TTA CTC GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCG GAC TAC AAA G 3' (SEQ ID NO:51).

Unterstrichen sind Flag-tag-Sequenzen innerhalb jedes V_L-back-Primers (Kappa; κ und Lambda; λ).

Nach dem Abbau mit dem Restriktionsenzym SfiI wurden die sFv-Fragmente (ca. 750 bp) entweder gelgereinigt (Qiaquick; Gel Extraction Kit, Qiagen, Hilden) oder elektroeluiert (Schleicher & Schüll, Dassel) und dann in den Phagemid-Vektor pAK100 (Krebber, A. et al., J. Immunol. Methods, 201:35-55 (1997)) ligasiert. Dieser Vektor ermöglicht die Expression von sFv als Gen-III-Fusionsprotein auf

- 18 -

der Oberfläche von Bakteriophagen (Phagen-Display) unter Einführung eines C-terminalen c-myc-Tags.

Die resultierenden Plasmide aller 5 Patienten wurden verwendet, um elektrokompetente *E. coli* XL1-Blue (Stratagene, Amsterdam Zuidooost, Niederlande) zu transformieren und so eine große Bibliothek von rekombinanten humanen sFv-Fragmenten im pAK100-Expressionsvektor zu schaffen (Krebber A. et al., J. Immunol. Methods, 201:35-55 (1997)). Transformanten wurden in 2 x YT-Medium, das 25 µg/µl Chloramphenicol und 1% Glucose enthielt, bis zu einer OD₅₅₀ von 0,5 hochgezogen. Zu diesem Zeitpunkt wurde die aufgebaute Phagemid-Bibliothek als koloniebildende Einheiten (cfu) titriert. Die Größe der Bibliothek von allen 5 Patienten betrug 2×10^6 . Die Bibliothek wurde dann mit 10^{11-12} VCSM13-Helferphagen (Amersham Pharmacia, Freiburg) infiziert, um sFv-tragende Phagen zu erzielen. Die Expression wurde durch die Zugabe von 0,5 mM IPTG (Roth, Karlsruhe) induziert und 2 h lang bei 24 °C durchgeführt. Nach 3–4 Stunden Inkubation wurde Kanamycin (30 µg/µl; Fluka, Neu-Ulm) hinzugefügt, und die rekombinante Phagenkultur wuchs über Nacht bei 24°C. Die Phagenpartikel wurden durch Fällung mit 20% PEG/15% NaCl (Sambrook et al., 1989) geerntet, in PBS gelöst und bei 4°C gelagert oder direkt für weitere Experimente verwendet.

Affinitätsselektion (Panning): Rekombinante Phagen, die humane sFv-Fragmente trugen, wurden durch Panning anhand ihrer Affinität zur Bindung an NS3 selektiert. Eine Mikrotiterplatte (Nunc, Gibco BRL, Karlsruhe) wurde über Nacht bei 4°C mit 1 µg rekombinantem NS3-Protein/Napf (Mikrogen, München) beschichtet. Nach Blockierung mit 3% BSA während 1 h bei RT wurde eine Phagensuspension (ungefähr 10^9 , verdünnt in 3% BSA) hinzugefügt, und es wurde 2 h bei RT inkubiert. Die Mikrotiterplatte wurde gründlich (20x) mit PBS/0,1% Tween-20 gewaschen, um unspezifisch gebundene Phagen zu eliminieren. Anschließend wurden die mit hoher Affinität an NS3 gebundenen Phagen mit 0,1 M Glycin/HCl, pH 2,2, eluiert. Die Phagenlösung wurde mit 2 M Tris neutralisiert, und die Phagen (typischerweise 10^{3-4}) wurden zur Reinfektion von *E. coli* XL1-Blue verwendet, das sich im exponentiellen Wachstum befand. Dieser Panning-Vorgang wurde 4-mal wiederholt. Die selektierte Phagenpopulation

- 19 -

wurde verdünnt und ausgestrichen, um einzelne monoklonale Kolonien zu erhalten.

Phagen-EIA: Ausgewählte Einzelkolonien wurden getrennt in 8 ml 2 x YT-Medium, das Chloramphenicol (25 µg/µl) und Glucose (1%) enthielt, bei 37°C unter Schütteln gezüchtet und dann mit 10^{11} VCSM13-Helferphagen infiziert. Die Expression von Human-sFv wurde mit 0,5 mM IPTG induziert. Nach Inkubation über Nacht wurden monoklonale Phagen mit 20% PEG/15% NaCl präzipitiert und in 200 µl PBS gelöst. Der Phagentiter wurde als cfu/ml abgeschätzt, und die Phagenlösung wurde wie folgt in einem EIA-Assay verwendet. Eine EIA-Platte wurde zunächst über Nacht bei 4 °C mit 0,3 µg NS3 (Mikrogen) beschichtet und dann 1 h bei RT mit 3% BSA blockiert. Dann wurden 50 µl einer Phagenlösung (ungefähr 10^9 Phagen) hinzugefügt. Nach 1 h Inkubation bei RT und dreimaligem Waschen mit PBS/0,05% Tween-20 wurde in 3% BSA 1/5000 verdünnter HRP-konjugierter Anti-M13-Antikörper (Amersham Pharmacia, Freiburg) hinzugefügt und 1 h lang inkubiert. Zur Detektion erfolgte eine Inkubation mit ABTS-Substrat nach den Angaben des Herstellers (Boehringer, Mannheim). Nach 15 min Inkubation wurde die Extinktion bei 405 nm mit einem EIA Reader (Anthos Labtec, Salzburg, Österreich) gemessen. Alle Assays wurden vierfach in 3 unabhängigen Experimenten durchgeführt.

Sequenzierung: Sequenzierungsreaktionen wurden mit einem automatischen ABI-310-Sequencer (Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim) durchgeführt, wobei Standardsequenzierungsvorschriften und spezifische Vektoroligonucleotide verwendet wurden. Dann wurden die abgeleiteten Aminosäuresequenzen durch Computerrecherche mit BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast>) und DNAPLOT (<http://www.genetik.uni-koeln.de/dnaplot>) und der Kabat-Datenbank (<http://immuno.bme.nwu.edu>) (Kabat E. A. et al., 5th ed. Bethesda, MD (1991); Martin A. C. R., Proteins: Structure, Function and Genetics, 25:130-133 (1996)) analysiert.

Lösliche Expression von humanen sFv-Fragmenten in E. coli: Zur löslichen Expression wurden sFv-Fragmente zunächst in pQE-70 (Quiagen, Hilden) umklontiert. Dieser Vektor ermöglicht eine starke induzierbare Expression in E.

- 20 -

coli und führt ein His-tag ein, das für die Proteinreinigung nützlich ist. Einzelne Kolonien wurden über Nacht bei 37 °C in 30 ml 2 x YT-Medium (Chloramphenicol, 25 µg/µl, und Glucose, 1%) inkubiert. Bei einer $OD_{550} = 0,8$ wurde die Expression der humanen sFv-Fragmente mit 1 mM IPTG induziert und die Bakterien 4 h lang bei 24 °C unter Schütteln gezüchtet. Nach dem Sedimentieren wurden Bakterienzellen 0,5 h lang bei 4 °C in Spheroblasten-Puffer (200 mM Tris/HCl, pH 8,0, 0,5 M Saccharose) inkubiert. In das Periplasma sezernierte lösliche sFv-Fragmente wurden durch Lysozymbehandlung (0,8 mg/ml, wobei nur die äußere Membran von E. coli zerstört wurde) und milden osmotischen Schock gewonnen, wobei die Spheroblasten intakt blieben (Skerra, 1989). Das Zellsediment aus 10 ml Expressionskultur wurde in 200 µl eiskaltem Spheroblastenpuffer resuspendiert, und 790 µl eiskalter 50%iger (v/v) Spheroblastenpuffer wurde sofort hinzugefügt. Die Lyse wurde 30 min lang auf Eis zu Ende geführt. Es wurde ein Standardverfahren für die Reinigung von mit einem His-Tag ausgestatteten sFv gewählt, das aus einem Ni-NTA-Affinitätsreinigungsschritt (HisTrap-Säulen, Amersham Pharmacia, Freiburg) mit einem Elutionsschritt unter nativen Bedingungen unter Verwendung von Imidazol (100-150 mM) bestand. Dieses Verfahren wurde unter Verwendung eines FPLC-Systems nach den Angaben des Herstellers (Amersham Pharmacia, Freiburg) durchgeführt.

Immunoblot-Analyse: Für eine weitere Immunoblot-Analyse wurde 1/100 gereinigte sFv-Fraktion verwendet. Im Einzelnen wurde ein 20-µl-Aliquot jeder Probe auf ein 0,1% SDS/ 12% PÄGE geladen. Nach Transfer auf eine Nitrozellulosemembran (Protran, Schleicher & Schüll, Dassel) unter Verwendung von Standardvorschriften wurden die sFv-Fragmente durch Immunoblot nachgewiesen. Die Membran wurde zuerst 1 h lang bei RT mit 3% BSA in TBS blockiert, um eine unspezifische Adsorption zu verhindern, und dann zweimal mit TBS gewaschen. Anschließend erfolgte eine Inkubation entweder mit Anti-Flag-mAB M1 (Sigma Aldrich, Taufkirchen) oder mit Anti-Tetra-His-Antikörpern (1:2000 in 3% BSA/TBS) (Qiagen, Hilden) während 30 min unter Verwendung von 10 µg/ml in TBS/1 mM $CaCl_2$. Nach Waschen mit TBST (2mal) für den Anti-His-Nachweis oder mit TBS + 1 mM $CaCl_2$ für den Anti-Flag-Nachweis wurde in TBS auf 1:5000 verdünntes Konjugat von Meerrettich-Peroxidase (HRP) und Kaninchen-Anti-

Maus-Ab (Biorad, München) hinzugefügt. Die Detektion erfolgte durch Chemilumineszenz über das ECLTM-System (Amersham Pharmacia, Freiburg).

sFv-EIA: Die Bindungsaktivität löslicher sFv-Fragmente wurde durch EIA getestet. Die Näpfe wurden über Nacht bei 4 °C mit 0,5 µg rekombinantem NS3-Protein in PBS beschichtet und anschließend 1 h lang bei RT mit 3% BSA blockiert. Dann wurde periplasmatischer Extrakt, der lösliche monoklonale sFv-Fragmente enthielt, zugegeben (1, 0,1 bzw. 0,01 µg in PBS/Napf) und 1 h lang bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 5 Waschschritten mit TBST/0,5% Tween[®]-20 wurde der Anti-His-Ab (1:2000 in 3% BSA; Qiagen, Hilden) zugegeben, und es wurde 1 h lang bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Näpfe gewaschen und 1 h lang mit HRP-konjugiertem Kaninchen-Anti-Maus-IgG-Ab (1:5000 in 10% Milchpulver) inkubiert. Zum Nachweis wurde ABTS-Substrat hinzugefügt, und A₄₀₅ wurde gemessen, wie es oben beschrieben ist.

Affinitätsmessungen: Die Bestimmung der Affinität der Antikörperfragmente erfolgte mit Hilfe eines kompetitiven EIA, der zuerst von Friguet et al. beschrieben wurde (Friguet B. et al., J. Immunol. Methods, 77:305-19 (1985)). Der zu testende Antikörper wurde mit verschiedenen Konzentrationen des Antigens inkubiert, bis ein Assoziations-Dissoziations-Gleichgewicht erreicht wurde. Dann wurde ein Festphasen-EIA mit immobilisiertem Antigen verwendet, um die Konzentration des freien Antikörpers zu bestimmen, der nicht an lösliches Antigen gebunden ist (Friguet B. et al., J. Immunol. Methods, 77:305-19 (1985)). Die EIA-Bedingungen wurden so gewählt, dass nur ein kleiner Anteil des im Gleichgewicht befindlichen ungesättigten Antikörpers durch das immobilisierte Antigen abgefangen wird. Dadurch ist sichergestellt, dass das Gleichgewicht in Lösung durch die EIA Bedingungen nicht wesentlich beeinträchtigt wird (Goldberg M. E., Djavadi-Ohanian L., Curr. Opin. Immunol., 5:278-81 (1993)).

Verschiedene Konzentrationen der humanen sFv Fragmente wurden getestet, um den linearen Bereich der Sättigungskurve zu bestimmen. Hierzu wurden serielle Verdünnungsreihen der Antikörper mit anschließender Bestimmung der OD durchgeführt. Die Verdünnung der sFv-Fragmente, die zu einem Abfall der OD um mindestens 40% führte, wurde für weitere kompetitive EIA-Experimente

- 22 -

gewählt. sFv-Fragmente in dieser Konzentration wurden 2 h lang bei 4 °C mit löslichem rekombinantem NS3-Protein inkubiert, um ein Gleichgewicht zu erreichen. Anschließend wurde die Konzentration der freien sFv-Fragmente in sFv-EIA bestimmt, wie es oben beschrieben ist, wobei mit 0,3 µg NS3 beschichtete Platten verwendet wurden, die zuvor mit 10% Milchpulver blockiert worden waren. Die Bestimmung der Affinität erfolgte für jedes einzelne Antikörperfragment in Korrelation zum linearen Teil der Kompetitionskurve.

Resultate

Seren von 4 Patienten wurden im Immunoassay auf die Anwesenheit von Antikörpern gegen NS3-Protein analysiert. Aus diesem Antikörper-Screening erhaltene Daten zeigten, dass 3 von 4 Patienten hohe Titer von 1:16 000 gegen NS3 aufwiesen. Der Titer von einem Patienten (Patient 3) war niedrig und ähnlich wie bei den negativen Kontrollen (kein erster Antikörper oder irrelevante rekombinante sFv-Fragmente). Die individuellen Titer der Patienten sind in Figur 1 gezeigt.

Um eine rekombinante humane Phagen-Display-Bibliothek zu schaffen, setzten wir den sFv-exprimierenden Phagemidvektor pAK100 ein. Anfangs entstanden durch Overlap-Extension-PCR einzelkettige Fragmente, die aus rekombinierten variablen Domänen der schweren (V_H) und der leichten Kette (V_L) mit einem eingeschobenen flexiblen Polypeptid-(Gly₄Ser)₄-Linker bestanden (Figur 2).

Anschließend wurden sFv-Fragmente in den pAK100-Expressionsvektor einkloniert (Krebber A. et al., J. Immunol. Methods, 201:35-55 (1997)), der TH-Terminator, lacI-Gen und lac-Promotorbereich enthielt, wodurch optimale Wachstumsbedingungen für transformiertes *E. coli* XL1-Blue geschaffen wurden, das in 2 x TY-Medium inkubiert wird, dem 1% Glucose zugesetzt ist (siehe Abschnitt "Materialien und Methoden"). Unter diesen Bedingungen kann eine unerwünschte toxische Wirkung sowie eine Hintergrundexpression vollständig ausgeschlossen werden, bevor eine weitere Induktion mit IPTG erfolgt (Krebber A. et al., J. Immunol. Methods, 201:35-55 (1997)). Eine optimale Produktion von gIII-fusioniertem sFv wurde durch 4 h Inkubation bei RT erzielt.

Die auf der Oberfläche von filamentösen Phagen exprimierten rekombinanten sFv wurden in einer Panning-Reaktion mit an eine feste Phase gebundenem NS3 selektiert. Polyklonale Phagen wurden in 4 Cyclen Phagen-Panning verwendet, um funktionelle bindende Phagen anzureichern und nichtbindende Phagen zu eliminieren (siehe die nachfolgende Tabelle 1 und Figur 3).

Tabelle 1:

Panning	Phagentiter vor dem Panning	Phagentiter nach dem Panning
1.	3×10^{12}	1×10^4
2.	3×10^{11}	5×10^3
3.	2×10^{10}	8×10^3
4.	4×10^{11}	4×10^4

Tabelle 1 zeigt die relative Anreicherung von Phagen, die monoklonales sFv tragen, gegen NS3-Protein (SEQ ID NO:18) vor der Verwendung beim Panning und nach dem ersten, zweiten, dritten und vierten Durchgang der Affinitätsselektion. Der Phagentiter wurde als cfu/ml gemessen. Die Anzahl der sFv-tragenden Phagen während des Panning wurde durch Verdünnungsreihen als cfu/ml bestimmt. Vor jedem Durchgang des Panning wurde die Phagenpopulation auf 10^{10-12} amplifiziert und dann einer Affinitätsselektion gegen rekombinantes HCV-NS3 unterzogen. Nach dem Waschen wurden an NS3 gebundene Phagen mit 0,1 M Glycin/HCl, pH 2,2, eluiert, wie es im Abschnitt "Materialien und Methoden" beschrieben ist. Der Prozentsatz der nach dem Panning eluierten Phagen nimmt stetig zu, was darauf hindeutet, dass gegen HCV-NS3 bindende Phagen angereichert werden.

Nach der Neuinfektion von *E. coli* XL₁-Blue mit sFv-tragenden Phagen gegen NS3 wurden Zellen ausgestrichen, um einzelne Kolonien zu bilden. Nur im Falle einer EIA-Reaktion (Signal-Rausch-Verhältnis) von wenigstens 2,4 oder darüber im Vergleich zur negativen Kontrolle (neg.Ctrl) wurden die sFv-Klone als spezifisch an HCV-NS3 bindend angesehen, wie es in Figur 4 gezeigt ist. Monoklonale Kolonien wurden selektiert und sequenziert. Während der Sequenzierung erwiesen sich einige der selektierten Klone als mehrfach repräsentiert.

- 24 -

Für eine Expression von löslichem sFv in *E. coli* auf hohem Niveau und Einführung eines Hexa-His-Tags wurden alle sFv-Fragmente in pQE-70 (Qiagen, Hilden) umklontiert. Nach der Induktion mit IPTG und Inkubation bei RT während 4 h wurden lösliche sFv-Moleküle unter Verwendung der Methode des kalten osmotischen Schocks aus dem periplasmatischen Raum geerntet. Ein Immunoblot-Verfahren wurde durchgeführt, um die korrekte Expression und Größe der in *E. coli* exprimierten klonierten sFv-Fragmente gegen NS3 zu bestimmen. Eine starke und deutliche Bande von 32 kDa wurde mit Anti-Flag sowie mit Anti-Tetra-His-Antikörpern sichtbar gemacht (Figur 6).

Die weitere Reinigung des rekombinanten sFv erfolgte unter Verwendung des Ni-NTA-Säulenreinigungssystems und FPLC, wie es im Abschnitt "Materialien und Methoden" beschrieben ist. Nach der Reinigung waren keine unspezifischen Banden zu sehen, wenn sFv auf 12% PAGE geladen, auf eine Nylonmembran übertragen und mit Ponceaus Rot oder Coomassie Brilliant Blue gefärbt wurde.

Die Reaktivität löslicher gereinigter rekombinanter sFv-Fragmente gegen NS3 wurde durch EIA getestet (Figur 6). Bei sechs verschiedenen Klonen wurden im Vergleich zu verschiedenen Kontrollen starke und spezifische Signale erhalten.

Die codierende Sequenz von Phagemid-DNA wurde bestimmt, und die Aminosäuresequenz der variablen Domänen der Antikörperfragmente wurde abgeleitet (siehe Figur 7). Die Positionen von Gerüstregionen (FR) und komplementaritätsbestimmenden Regionen (CDR) wurden gemäß dem Nummerierungssystem von Kabat et al. (Kabat E. A. et al., 5th ed. Bethesda, MD (1991)) lokalisiert. Figur 7 zeigt einen Vergleich der sFv-Sequenzen.

Fünf Antikörper weisen λ -leichte-Ketten auf, und ein Antikörper weist κ -leichte-Ketten auf (siehe Tabelle 2A (leichte Kette) und 2B (schwere Kette)). Eine weitere Analyse durch DNA-Plot (<http://www.genetik.uni-koeln.de/dnaplot>) oder Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast>) enthüllte die Keimlinien-V(D)J-Segmente (Tabelle 2). Weitere Merkmale der Antikörper sind in Tabelle 2 gezeigt. V(D)J-Keimlinienssegmente, die die größte Ähnlichkeit mit der Sequenz des Antikörpers zeigten, sind genannt.

Messungen der Affinität von Antikörperfragmenten erfolgten unter Verwendung von kompetitivem EIA. Alle Antikörper zeigten hohe Affinitäten gegen NS3. Die Affinitätskonstanten K_D lagen in der Größenordnung von 10^{-6} bis 10^{-7} M (Figur 8).

Tabelle 2A (leichte Kette (V_L)):

Klon (SEQ ID NO)	Klasse	Untergruppe	Familie	V-Segment	J-Segment
1-1 (1)	λ	I	II	V1-19	JL2
1-2 (2)	λ	II	III	V1-4	JL2
1-4 (3)	λ	II	III	V1-7	JL3
8-1 (4)	λ	VI	n.k.	V1-22	JL1
7-4 (5)	λ	I	X	V1-13	JL2
10-1 (6)	λ	III	VIII	V2-13	JL2
10-2 (7)	λ	III	VIII	V2-13	JL3
9-1 (8)	κ	I	I	O2	JK1

Tabelle 2B (schwere Kette (V_H)):

Klon (SEQ ID NO)	Untergruppe	Familie	V-Segment	D-Segment	J-Segment
1-1 (9)	II	n.k.	V_H 4-39	D3-3	J_H 4
1-2 (10)	I	I	V_H 1-69	D2-21	J_H 6
1-4 (11)	II	n.k.	V_H 4-31	D7-27	J_H 1
8-1 (12)	III	VI	V_H 3-21	D7-27	J_H 6
7-4 (13)	II	IV	V_H 4-28	D1-26	J_H 4
10-1 (14)	II	IV	V_H 4-39	D3-3	J_H 4
10-2 (15)	II	IV	V_H 4-39	D3-3	J_H 4
9-1 (16)	II	IV	V_H 3-1	D3-22	J_H 5

In Tabellen 2A und B sind die Klassifikation und Keimliniensegmente variabler Domänen von klonierten Antikörperfragmenten zusammengefasst. V_L -, J_L -, V_K -, J_K -, V_H -, D- und J_H -Segmente werden gemäß der Nomenklatur der bei den Methoden genannten Autoren benannt. Die Bestimmung der Familie und der Untergruppe erfolgte nach Kabat et al. (Kabat E. A. et al., 5th ed. Bethesda, MD (1991); Martin A. et al., Proteins: Structure, Function and Genetics, 25:130-133 (1996)) (n.k. = nicht klassifiziert).

Experiment 2:

Das Experiment 1 wurde wiederholt und dabei die in Tabelle 3 aufgeführten Antikörperfragmente isoliert.

Tabelle 3: Untergruppen der variablen Domänen der sFv Antikörper

Klon (SEQ ID NO)	Leichte Kette/Untergruppe	Schwere Kette/Untergruppe
sFv 41 (52)	humane κ Kette/ I	humane schwere Kette/ II
sFv 44 (53)	humane κ Kette/ I	humane schwere Kette/ II
sFv 59 (54)	humane κ Kette/ I	humane schwere Kette/ III
sFv 20-0 (55)	humane λ Kette/ I	humane schwere Kette/ III
sFv 52 (56)	humane λ Kette/ III	humane schwere Kette/ III
sFv 6 (57)	humane λ Kette/ I	humane schwere Kette/ I
sFv 42 (58)	humane λ Kette/ III	humane schwere Kette/ n.i.

Experiment 3: Enzymatischer Assay für die NS3-Helikaseaktivität

Rekombinante NS3 Helikase, Expression und Reinigung: Rekombinante NS3 Helikase wurde in Insektenzellen unter Verwendung des Bac-to-Bac Baculovirus Expressionssystems (Gibco BRL) hergestellt. Die helikase-kodierende Sequenz wurde in pFastBachTa geklont und in MAX Efficiency DH10Bac transformiert. Rekombinantes Bacmid wurde isoliert, mit CellFECTIN Reagenz (Gibco BRL) entsprechend der Herstelleranleitung behandelt und in SF21 Insektenzellen transfiziert. SF21 Zellen wurden bei 27 °C in ergänztem Insektenmedium nach Grace (Invitrogen), das 10% hitzeinaktiviertes fötales Rinderserum (Biochrom KG) and 10 µg/ml Gentamycin enthielt, angezogen. Rekombinantes Baculovirus wurde 96 Stunden nach der Transfektion gesammelt, in SF21 Zellen weitervermehrt und verwendet, um High Five™ Insektenzellen (Invitrogen) für die rekombinante Proteinherstellung zu infizieren. High Five™ Insektenzellen wurden in Ultimate Insect™ serumfreiem Medium (Invitrogen) als anhaftende Zellkultur vermehrt und vier Tage nach der Infektion geerntet. Etwa 10⁸ Zellen wurden in

- 27 -

10 ml Lysepuffer enthaltend 50 mM NaPO₄, 0,3 M NaCl, 10 mM β-Mercaptoethanol, 20% Glycerin, 2% Triton®-100, 0,5% Nonidet P-40, 1mM Phenylmethylsulfonylfluorid, 4µg/ml Leupeptin bei pH 8,0 resuspendiert, und durch Ultraschall zerrissen (vier 30 s Impulse mit 30 s Intervallen auf Eis). Der durch Zentrifugation bei 12000 g for 30 Minuten erhaltene Überstand wurde mit 0,5 ml Ni-NTA Agarose (Qiagen) gemischt and 1 Stunde unter Schütteln bei 4 °C inkubiert. Die Lysat-Ni-NTA Mischung wurde auf eine Säule aufgetragen und mit 20 ml Lysepuffer enthaltend 20 mM Imidazol gewaschen. Das an Helikase-His(6) angehängte Fusionsprotein wurde mit 200 mM Imidazol in Lysepuffer ohne Proteaseinhibitoren and β-Mercaptoethanol eluiert und über Nacht gegen 50 mM NaPO₄, 0,3 M NaCl, 20% Glycerin, 0,5% Triton®-100, bei pH 8,0 dialysiert. Die Ergebnisse der Helikaseherstellung und -Reinigung sind in Figur 10 zusammengefasst.

Helikaseaktivitäts-Assay: Der Helikaseaktivitäts-Assay wurde als ELISA wie von Hsu, C. et al. (Biochemical and Biophysical Research Communications, 253:594-599 (1998)) beschrieben mit den folgenden Modifikationen entwickelt. Das Substrat bestand aus zwei annealierten komplementären DNA-Strängen, dem 5'-biotin-markierten Templatstrang: 5'-GGTTTAAAAA ATAGGAGGGA CAACGTCGTG ACTGGGAAAA CTCCCCGGGT ACCGAGCTCG-3' (SEQ ID NO:66) und dem 5'-digoxigenin-markierten Freisetzungsstrang: 5'-GTTTTCCTCAG TCACGACGTT GT-3' (SEQ ID NO:67; MWG Biotech). Das Annealing der zwei Oligonukleotide in einem Molverhältnis von 1:3 (Templat:Freisetzung) wurde in 10 mM Tris/HCl, 25 mM NaCl, 1 mM EDTA bei pH 7,6 durch Erhitzen auf 100°C für 10 Minuten and langsames Abkühlen auf Raumtemperatur durchgeführt. High binding polystyrene ½ area Mikrotiterplatten (Costar) wurden mit 10 µg/ml Streptavidin (Fluka) beschichtet and mit 2% BSA in PBS blockiert. Das Substrat wurde bei einer Konzentration des Templatstranges von 0,2 pM pro Vertiefung (50 µL) auf die blockierte Platte überführt and für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach intensivem Waschen mit Puffer M (25 mM MOPS, 2 mM DTT, 3 mM MgCl₂) wurde HCV Helikase in Puffer M ergänzt mit 2,5 mM ATP and 20 pM pro Vertiefung Abfangoligo, komplementär zum Freisetzungsstrang: 5'-ACAACGTCGT GACTGGGAAA AC-3' (SEQ ID NO:68), hinzugefügt. Die Platte wurde 15 Minuten unter Schütteln bei Raumtemperatur und eine Stunde stationär bei 37 °C inkubiert, dann dreimal mit Puffer M und dreimal mit PBS gewaschen. Freisetzungsstrang,

- 28 -

der nicht durch Helikase entwunden wurde, wurde mit anti-digoxigenin-alkalischer Phosphatase, Fab-fr. vom Schaf (Roche), gefolgt von *p*-Nitrophenylphosphat detektiert. Die Absorption wurde bei 405 nm gemessen. Die Ergebnisse der Helikaseinhibitionstests sind in Figuren 11 und 12 zusammengefasst. Hieraus ist ersichtlich, dass die Bindung der erfindungsgemäßen Antikörperfragmente teilweise zu einer 100%igen Inhibition der Helikaseaktivität führt. Da es sich bei der HCV-Helikase um ein essentielles Virusprotein handelt, d. h. ein Virusprotein, welches für die Vermehrung des HCV unerlässlich ist, wird nach diesseitiger Auffassung eindeutig gezeigt, dass mit den einzelkettigen Antikörperfragmenten der vorliegenden Erfindung eine Vermehrung des HCV verhindert werden kann.

Detaillierte Beschreibung der Figuren

Figur 1: Serumantikörpertiter von 4 Patienten mit chronischer HCV-Infektion gegen rekombinantes NS3-Protein wurden durch EIA bestimmt. Eine Verdünnungsreihe von Seren wurde in Näpfen inkubiert, die mit rekombinantem NS3-O/N beschichtet waren, und mit Konjugaten von Alkalischer Phosphatase (AP) und Ziegen-Anti-Human-(Fab)₂-IgG (verdünnt 1:5000, Boehringer Mannheim) detektiert. Die EIA-Reaktivität wurde in vier Parallelversuchen als OD bei 405 nm gemessen, nachdem *p*-Nitrophenylphosphat als Chromogen hinzugefügt worden war. Drei Patienten (Patient Nr. 1, 2 und 4) zeigen einen sehr hohen Ab-Titer von 1:16 000. Ein Patient zeigt keinen signifikanten Titer gegenüber HCV-NS3.

Figur 2: Gel-Elektrophorese von sFv-cDNA-Fragmenten, die durch immunglobulinspezifische PCR erzeugt wurden. Anfangs wurden VL und VH durch 6 bis 7 verschiedene Primerpaare getrennt amplifiziert (Einzelheiten siehe "Materialien und Methoden"). PCR-Produkte der Kappa-Ketten κ_1 - κ_6 (Bild A), der Lambda-Ketten λ_1 - λ_7 (Bild B) und der schweren Ketten H1-H6 (Bild C) sind gezeigt, geladen auf ein 1,5% Agarose-Gel. Anschließend wurde eine Overlap-Extension-PCR unter Verwendung von pull-through-Primern (äußeren Primern) eingesetzt, die SfiI-Restriktionsstellen enthielten, so dass sFv-Fragmente entstanden, die aus VL- und VH-Domänen bestanden, die durch einen flexiblen Aminosäurelinker miteinander verbunden waren. Bild D zeigt sFv-PCR-Produkte einschließlich der

- 29 -

leichten Ketten $V_{L\kappa}$ (K+H, Bahn 2) oder $V_{L\lambda}$ (λ +H, Bahn 3), die getrennt amplifiziert wurden. Verschiedene Untergruppen von V_L oder V_H sind bei einzelnen Patienten stärker als andere repräsentiert. Zum Beispiel zeigt der hier gezeigte Patient stärkere Signale für λ_2 und λ_6 als für λ_4 und λ_5 . Andere Patienten zeigten andere Muster der Untergruppenrepräsentation (Daten nicht im Einzelnen gezeigt).

St = Standard-kb-Marker (Gibco BRL, Karlsruhe).

Figur 3: Anreicherung von Phagen mit sFv-Fragmenten, die Bindungsaffinität gegen rekombinantes NS3 zeigen, während verschiedener Durchgänge der Affinitätsselektion (Panning). HRP-konjugierter Anti-M13-Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:5000 verwendet, und dann wurde ABTS-Substrat hinzugefügt, wie es im Abschnitt "Materialien und Methoden" beschrieben ist. Die OD wurde bei 405 nm gemessen. Die OD nimmt mit weiteren Durchgängen des Panning stetig zu, was darauf hinweist, dass der Prozentsatz von Phagen mit Bindungsaffinität gegen NS3 zunimmt. BSA: mit 3% BSA beschichtete Näpfe; neg. Ctrl: mit NS3-Protein beschichtete und mit nichtbindendem Helferphagen inkubierte Näpfe.

Figur 4: Identifikation von monoklonalen Phagen, die sFv mit Bindungsaktivität gegen NS3-Protein tragen, durch Phagen-EIA. Die Phagenpopulation nach 3 Panning-Durchgängen wurde verdünnt, und monoklonale Phagen wurden amplifiziert. Ungefähr 10^8 monoklonale Phagen wurden in einem Phagen-EIA gegen NS3 eingesetzt, um positiv bindende gegen NS3 zu selektieren. Nach Inkubation mit 1:5000 verdünntem HRP-konjugiertem Anti-M13-Antikörper und Zugabe von ABTS-Substrat wurde die OD bei 405 nm gemessen. Die Klone Nr. 3, 6, 7, 10, 11, 12, 13, 15, 16 wurden aufgrund ihrer bindenden Eigenschaften gegen NS3 identifiziert und für die weitere Analyse selektiert.

Figur 5: EIA von gereinigten löslichen sFv-Fragmenten gegen NS3. sFv-Fragmente wurden aus periplasmatischen Extrakten von *E. coli* durch Ni-NTA-Säulen bis zur Homogenität gereinigt. Nach der Beschichtung von Näpfen mit NS3-O/N werden gereinigte sFv inkubiert. Anschließend wurden Anti-Tetra-His-Antikörper und anschließend HRP-konjugierter Kaninchen-Anti-Maus-Antikörper verwendet,

- 30 -

und unter Verwendung des ECL-Substratsystems wurde eine Chemilumineszenz durchgeführt. Alle Klone zeigen eine starke Affinität zu NS3 im Vergleich zu BSA (negative Kontrolle).

Figur 6: Immunoblot-Analyse von bakteriell exprimierten rekombinanten sFv-Fragmenten. Um die Größe und Anwesenheit von bakteriell exprimierten sFv-Fragmenten zu demonstrieren wurden 50 µl Ganzzellfraktion von *E. coli* auf 12% SDS-PAGE-Gel geladen und mit Anti-Flag- (α -Flag-) und Anti-Tetra-His-(α -His)-Antikörpern nachgewiesen. Der Nachweis erfolgte unter Verwendung von HRP-konjugierten Kaninchen-Anti-Maus-Antikörpern und des ECL-Substratsystems. Wie erwartet, wurde eine deutliche Bande bei ungefähr 31 kDa nachgewiesen, die mit löslichen sFv-Fragmenten im Einklang stand.

Figur 7: Aminosäuresequenz der variablen Bereiche der L-Kette (Fig. 7A) und H-Kette (Fig. 7B) von selektierten humanen sFv aus Experiment 1. Die codierende cDNA von monoklonalem sFv, das in Phagen-EIA und sFv-EIA positiv gegen NS3 ist, wurde isoliert. Eine automatische Sequenzierung in beiden Richtungen wurde zweimal durchgeführt, um die Nucleotid- und Aminosäuresequenz von V_L und V_H zu bestimmen. Gerüstregionen (FR) und komplementaritätsbestimmende Regionen (CDR) gemäß der Nomenklatur von Kabat et al. (Kabat E. A. et al., 5th ed. Bethesda, MD (1991); Martin A. et al., Proteins: Structure, Function and Genetics, 25:130-133 (1996)) sind angegeben. Zwei Cysteinreste in den variablen Bereichen von V_L und V_H , die an strukturell konservierten Disulfidbrücken zwischen den Ketten beteiligt sind, sind halbfett gedruckt. Sequenzen, die durch die eingesetzten Primer beeinflusst sind, sind kursiv gedruckt.

Figur 8: Bakteriell exprimierte sFv wurden durch Ni-NTA-Säulen bis zur Homogenität gereinigt. Bei der Färbung mit Ponceau-Rot und Coomassie Brilliant Blue nach der Reinigung wurden keine unspezifischen Banden nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Gereinigte sFv-Fragmente wurden für einen kompetitiven EIA verwendet, um die Antikörperaffinität zu bestimmen. Anfangs wurden sFv-Konzentrationen des linearen Bereichs der Dosis-Bindungs-Kurve gewählt (Daten nicht im Einzelnen gezeigt). sFv wurden 2 h lang bei 4 °C mit unterschiedlichen Konzentrationen von löslichem NS3 inkubiert, um ein stabiles Assoziations-

- 31 -

Dissoziations-Gleichgewicht zu erreichen. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Konzentration an freiem sFv in Lösung mittels NS3-EIA. Die Figur zeigt eine abnehmende OD mit zunehmenden Konzentrationen an löslichem Antigen auf einer logarithmischen Skala. Die Affinitäten der gezeigten sFv liegen in der Größenordnung von 10^{-6} bis 10^{-7} M.

Figur 9: Aminosäuresequenz der variablen Bereiche der L-Kette (Fig. 7A) und H-Kette (Fig. 7B) von selektierten humanen sFv aus Experiment 2.

Figur 10: Herstellung und Reinigung des rekombinanten HCV-Helikaseenzym
HCV-Helikase wurde in Insektenzellen (Bac-to-Bac[®] baculovirus Expression System, Gibco BRL) hergestellt und mittels Ni-NTA (Qiagen) aufgereinigt. A: Nachweis der Helikaseexpression durch Western Blot in High Five[™] Insektenzellen mit Tetra-His[™]-Antikörpern (Qiagen). Spur 1: Gesamtzellextrakt der Baculovirus-inifzierten Insektenzellen. Spur 2: Kontrolle, Gesamtzellextrakt der nichtinifzierten Insektenzellen. Spur 3: Molekulargewichtsmarker. B: Reinigung von His-tag-Helikase mittels Ni-NTA-Agarose, SDS-Gelelektrophorese und Coomassiefärbung. Spur 1: Zellextrakt; Spur 2: Durchlauf; Spur 3: Waschfraktion; Spuren 4, 5, 6: Elutionsfraktionen; Spur 7: Molekulargewichtsmarker.

Figur 11A: Einfluss der Antikörperbindung auf die HCV-Helikaseaktivität

Der rekombinante sFv1-2-Antikörper wurde zusammen mit HCV-Helikase präinkubiert, anschließend wurde die Helikaseaktivität gemessen (PBS-Kontrolle). Der sFv1-2-Antikörper zeigte einen deutlichen inhibitorischen Effekt auf die Helikasefunktion.

Figuren 11B und 11C: Hemmung der HCV-Helikaseaktivität durch den sFv1-2-Antikörper.

11B: Affinitätsgereingte rekombinante Proteine für Helikaseassay (SDS-Gelelektrophorese, Coomassiefärbung). Spur 1: Molekulargewichtsmarker; Spur 2: rekombinante HCV-Helikase; Spur 3: sFv1-2-Protein.

11C: Konzentrationsabhängige Inhibition der Helikasereaktion durch die sFv11-2-Bindung. HCV-Helikase wurde zusammen mit ansteigenden Konzentrationen von sFv1-2 präinkubiert. Durch Bindung des sFv1-2-Antikörpers zeigte sich eine

100%ige Inhibition der Helikase.

Figur 12: Inhibition der Helicaseaktivität durch die rekombinanten sFv Antikörper des Experiments 2.

Patentansprüche

1. Einzelkettiges Fragment von einem humanen Antikörper, das die Vermehrung von Hepatitis-C-Virus (HCV) hemmt und das die variablen Bereiche der leichten Kette (V_L) und der schweren Kette (V_H) eines Antikörpers gegen ein oder mehrere essentielle Proteine von HCV umfasst.
2. Antikörperfragment nach Anspruch 1, das ein oder mehrere essentielle Proteine von HCV hemmt, vorzugsweise eine Affinität $K_D \leq 10^{-6}$ M, besonders bevorzugt $K_D \leq 10^{-7}$ M, für wenigstens ein essentielles Virusprotein aufweist.
3. Antikörperfragment nach Anspruch 1 oder 2, wobei die essentiellen Virusproteine ausgewählt sind aus Oberflächenproteinen (Envelope), Strukturproteinen (Core) und Nichtstrukturproteinen (NS) und vorzugsweise ausgewählt ist aus Envelop 1 (E1), Envelope 2 (E2), Core, NS3-Protease, NS3-Helicase, NS4A-Kofaktor und NS5B-RNA-Polymerase.
4. Antikörperfragment nach Anspruch 3, das NS3-Protease und/oder NS3-Helicase, vorzugsweise NS3-Helicase hemmt.
5. Antikörperfragment nach Anspruch 4, wobei der variable Bereich der leichten Kette (V_L) das in SEQ ID NOs:1 bis 8 gezeigte Peptid oder ein Derivat desselben umfasst, und/oder wobei der variable Bereich der schweren Kette (V_H) das in SEQ ID NOs:9 bis 16 gezeigte Peptid oder ein Derivat desselben umfasst.
6. Antikörperfragment nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5, wobei die Fragmente V_L und V_H durch eine kovalente Bindung oder durch ein Linkermolekül, insbesondere ein Linkerpeptid, miteinander verknüpft sind.
7. Antikörperfragment nach Anspruch 6, wobei V_L und V_H über ein Linkerpeptid, vorzugsweise über ein hydrophiles und/oder flexibles Linkerpeptid, besonders bevorzugt über ein Peptid mit der Aminosäuresequenz $(Gly_aSer_b)_x$ (wobei a eine ganze Zahl von 1 bis 7, vorzugsweise von 2 bis 5 ist, b eine ganze Zahl von 1 bis

- 34 -

4, vorzugsweise 1 oder 2 ist und x eine ganze Zahl von 1 bis 10, vorzugsweise von 2 bis 7 ist) miteinander verknüpft sind.

8. Antikörperfragment nach Anspruch 7, das eine der folgenden Peptidsequenzen oder ein Derivat derselben aufweist:

- (i) Peptid (SEQ ID NO:1)-(Gly₄Ser)_x-Peptid (SEQ ID NO:9)
- (ii) Peptid (SEQ ID NO:2)-(Gly₄Ser)_x-Peptid (SEQ ID NO:10)
- (iii) Peptid (SEQ ID NO:3)-(Gly₄Ser)_x-Peptid (SEQ ID NO:11)
- (iv) Peptid (SEQ ID NO:4)-(Gly₄Ser)_x-Peptid (SEQ ID NO:12)
- (v) Peptid (SEQ ID NO:5)-(Gly₄Ser)_x-Peptid (SEQ ID NO:13)
- (vi) Peptid (SEQ ID NO:6)-(Gly₄Ser)_x-Peptid (SEQ ID NO:14)
- (vii) Peptid (SEQ ID NO:7)-(Gly₄Ser)_x-Peptid (SEQ ID NO:15)
- (viii) Peptid (SEQ ID NO:8)-(Gly₄Ser)_x-Peptid (SEQ ID NO:16),
- (ix) Peptid (AS 1 bis 109 von SEQ ID NO:52)-(Gly₄Ser)_x-Peptid (AS 130 bis 254 von SEQ ID NO:52),
- (x) Peptid (AS 1 bis 109 von SEQ ID NO:53)-(Gly₄Ser)_x-Peptid (AS 130 bis 257 von SEQ ID NO:53),
- (xi) Peptid (AS 1 bis 115 von SEQ ID NO:54)-(Gly₄Ser)_x-Peptid (AS 136 bis 262 von SEQ ID NO:54),
- (xii) Peptid (AS 1 bis 117 von SEQ ID NO:55)-(Gly₄Ser)_x-Peptid (AS 138 bis 261 von SEQ ID NO:55),
- (xiii) Peptid (AS 1 bis 117 von SEQ ID NO:56)-(Gly₄Ser)_x-Peptid (AS 138 bis 262 von SEQ ID NO:56),
- (xiv) Peptid (AS 1 bis 117 von SEQ ID NO:57)-(Gly₄Ser)_x-Peptid (AS 138 bis 261 von SEQ ID NO:57),
- (xv) Peptid (AS 1 bis 116 von SEQ ID NO:58)-(Gly₄Ser)_x-Peptid (AS 127 bis 249 von SEQ ID NO:58),

wobei x 3, 4 oder 5 ist, vorzugsweise ein Antikörperfragment, das eine der oben genannten Peptidsequenzen (i) bis (xiv) mit x= 4 oder die Peptidsequenz (xv) mit x= 2 ist .

9. Antikörperfragment nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 8, die durch Expression in Prokaryonten, insbesondere durch Expression in *E. coli* erhältlich sind.

10. DNA-Sequenz, die für ein Antikörperfragment gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 8 kodiert.

11. Vektor oder Gentransfervektor, umfassend eine DNA-Sequenz gemäß Anspruch 10.

12. Verfahren zur Identifizierung von Antikörperfragmenten, die die Vermehrung von HCV hemmen, gemäß Ansprüchen 1 bis 8, umfassend

a) Klonierung einer DNA-Bibliothek, die Antikörperfragmente gegen ein oder mehrere essentielle Proteine von HCV kodiert;

b) Expression genannter Antikörperfragmente auf der Oberfläche von Bakteriophagen mit anschließender Anreicherung der Phagen, die Antikörperfragmente mit hoher Affinität für das essentielle Protein tragen, durch mehrere Zyklen der Selektion und Reamplifikation (Panning); und gegebenenfalls weiterhin

c) Vermehrung genannter Antikörperfragmente mit hoher Affinität durch lösliche Expression in Bakterienzellen und Isolierung der Antikörperfragmente aus dem Periplasma dieser Zellen.

13. Wirtszelle, insbesondere prokaryontische Wirtszelle, die mit einem Vektor gemäß Anspruch 11 transformiert ist und/oder eine DNA-Sequenz gemäß Anspruch 10 enthält.

14. Verfahren zur Herstellung eines Antikörperfragments nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 9, umfassend Kultivieren einer Wirtszellen gemäß Anspruch 13.

15. Pharmazeutische oder diagnostische Zusammensetzung, die einen oder mehrere Antikörperfragmente nach den Ansprüchen 1 bis 9 enthält.

16. Verwendung eines Antikörperfragments nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 9 zur Herstellung einer Vakzine, insbesondere einer Vakzine zur passiven Immunisierung.

- 36 -

17. Vakzinierungsverfahren umfassend das Verabreichen eines Antikörperfragments nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 9 an den zu vakzinierenden Patienten.

18. Pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend einen oder mehrere Gentransfervektoren, wie in Anspruch 11 definiert.

19. Verwendung eines Gentransfervektors gemäß Anspruch 11 zur Herstellung eines Medikaments zur Gentherapie, insbesondere zur Gentherapie von HCV-Infektionen.

20. Gentherapieverfahren, insbesondere Verfahren zur Behandlung von HCV-Infektionen, umfassend Verabreichen eines Gentransfervektors gemäß Anspruch 11 an den Patienten.

-1/13-

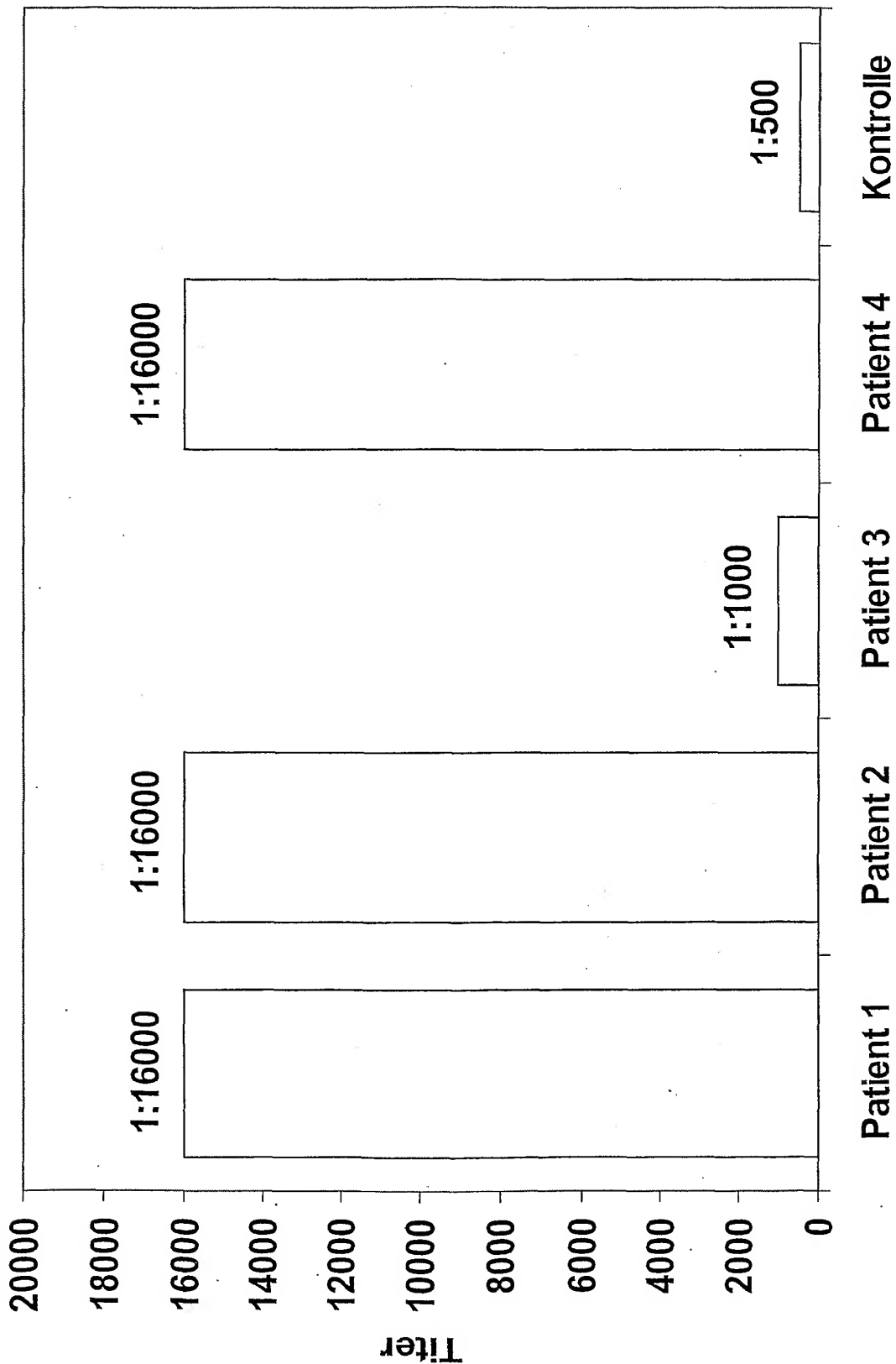


Fig.1

-2/13-

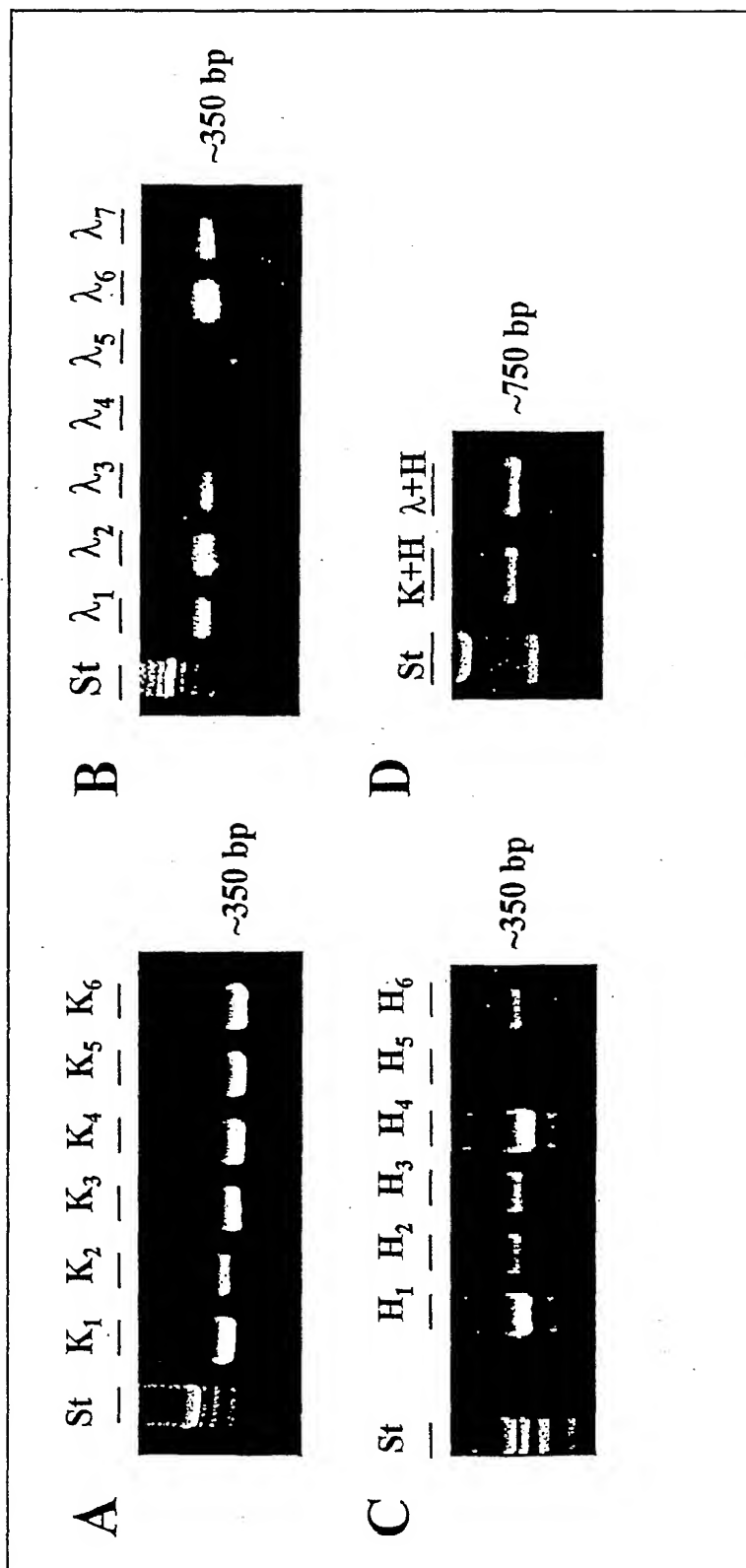


Fig.2

-3/13-

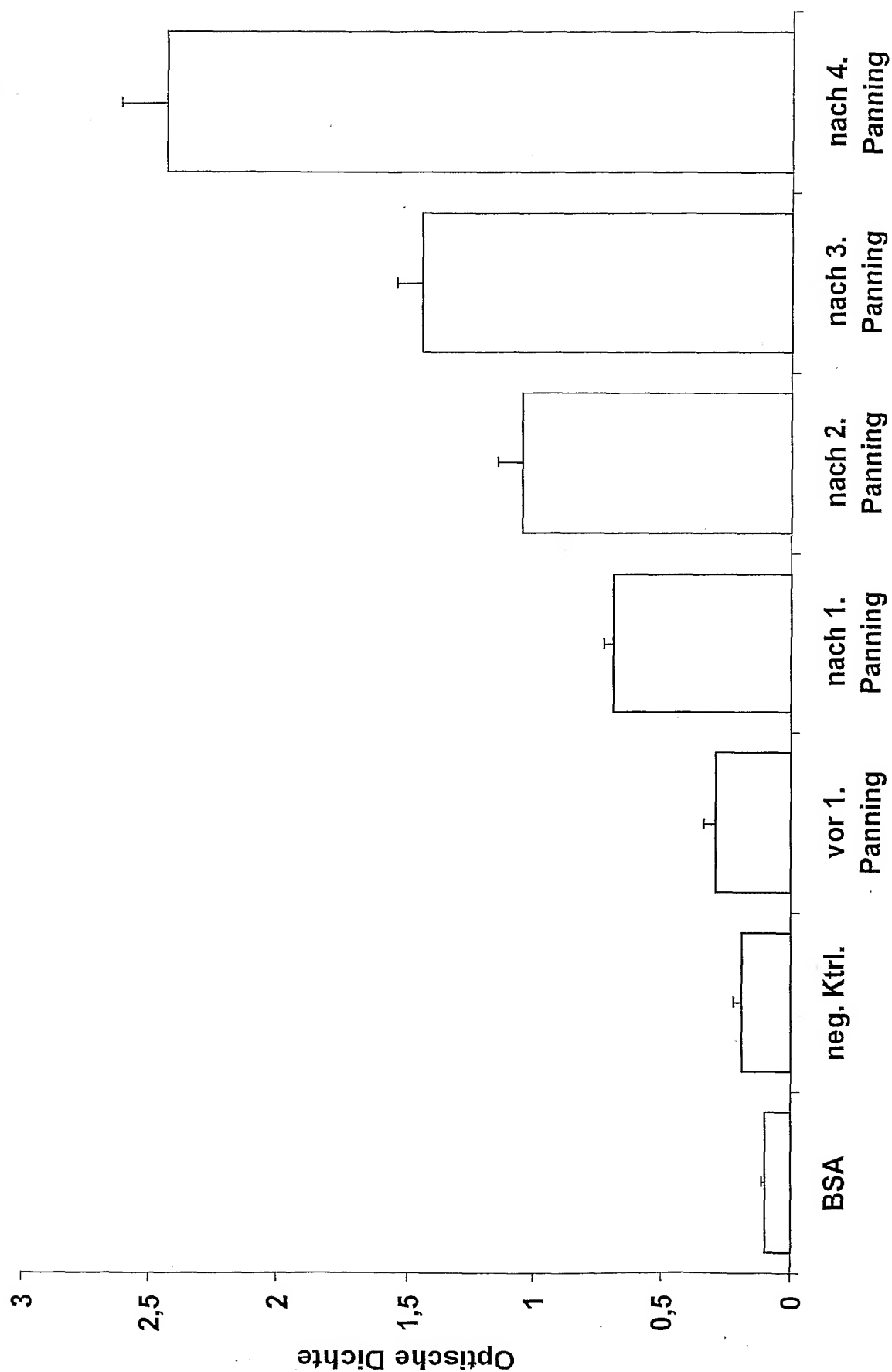
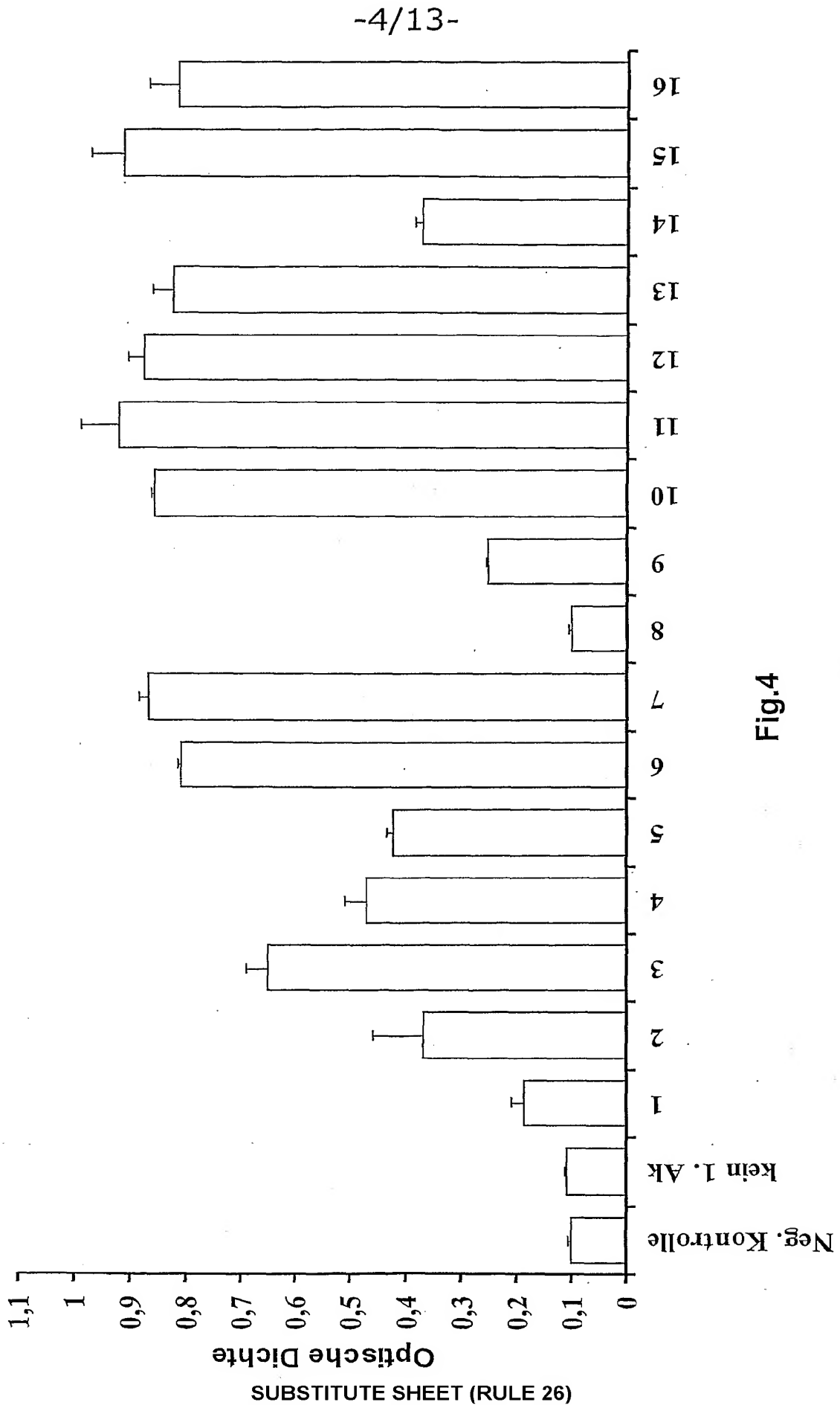


Fig.3



-5/13-

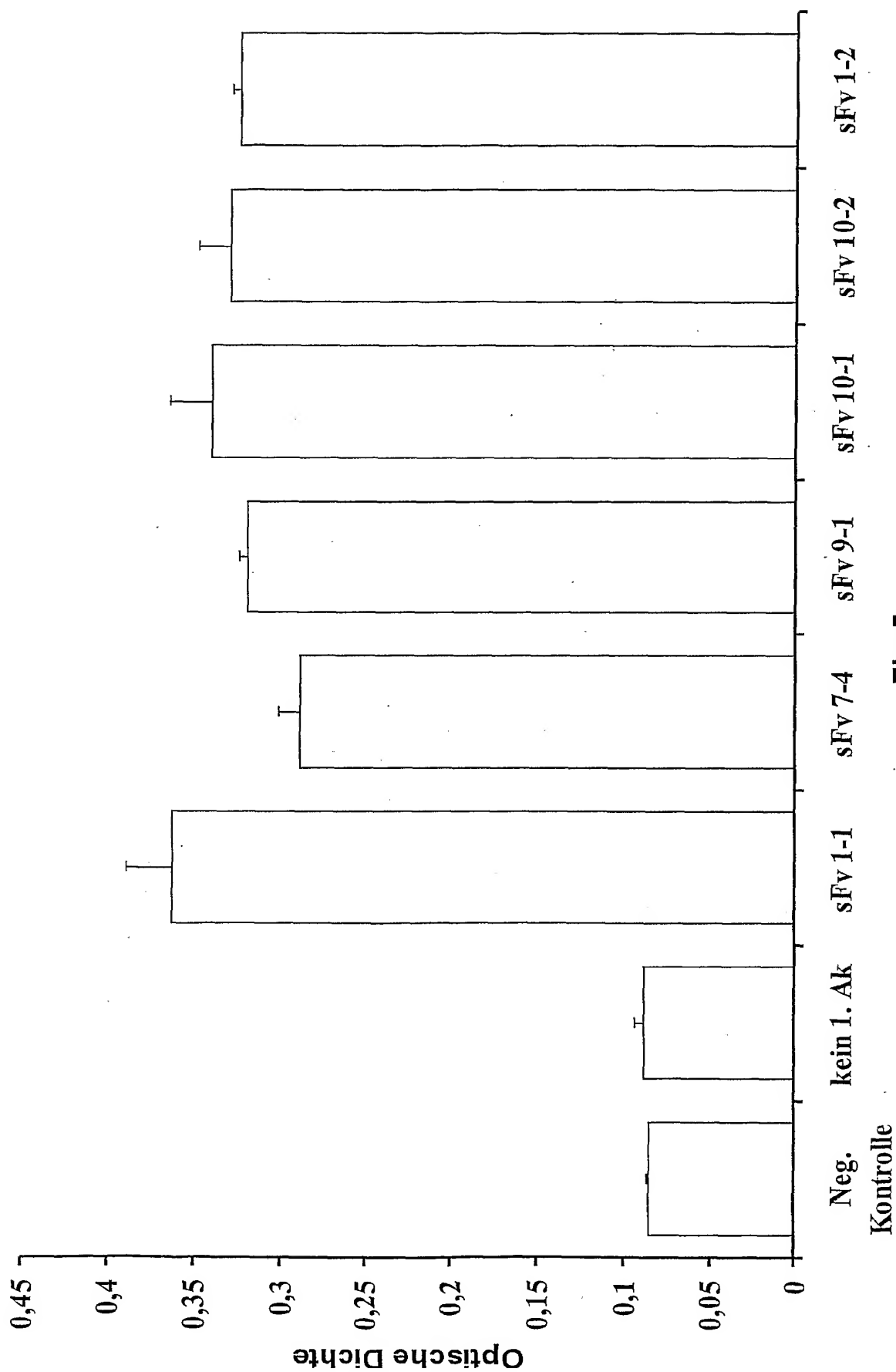


Fig.5

-6/13-

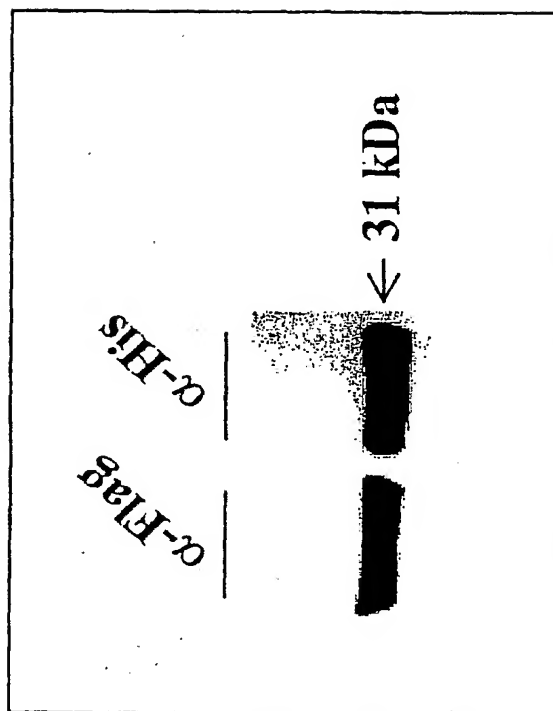


Fig.6

-7/13-

Fig. 7

Fig. 7A

FR-L1		CDR-L1	FR-L2	CDR-L2
1-1	HVILTQ PPSVSEAPGQKATISC	<u>SGTTSNIGNNYVS</u>	WYQQVPRAAPKLLIY	<u>EGNKRPS</u>
1-2	QFALTQ PAAVSGSPGQSITISC	<u>SGTSSDFHGHNYVS</u>	WYQHRPGKAPKLMY	<u>DVSNRPS</u>
1-4	QSALTQ PASVSGSPGQSITISC	<u>TGSSSDVGSYNLVA</u>	WYQQHPGKAPXIMY	<u>EGSERPS</u>
7-4	QSVLTQ PPSVSGAPGQRTISC	<u>TGSSSNIGTGVDVH</u>	WYQQLPGTAPKLLVN	<u>GKSNRPS</u>
8-1	NFMLTQ PHSVSESPGKTITISC	<u>TRSGGSITSNFEVH</u>	WYQQCPGNSLTMMY	<u>DHHKRPS</u>
9-1	EIVLTQSPSSLSASIGDRVITC	<u>RSSRSVRTSLN</u>	WYQLKRGRAPKALIF	<u>AASTLQS</u>
10-1	SSELTQ DPAVSVALGQTVKITC	<u>QGDNLRSSSAN</u>	WYQQKPGQAPILVIY	<u>NKDNRPS</u>
10-2	SSELTQ DPAVSVALGQIVRITC	<u>QGDSLRSSSAT</u>	WYQQKSGQAPLLVIS	<u>DDNTRPS</u>

FR-L3		CDR-L3	FR-L4
1-1	GIPDRFSGSQSGTSATLGITGLQTGDEADYYC	<u>VSWDSDL SAVL</u>	FGGGTQLTVLG
1-2	GVSARFSGSKSGDTASLTISGLQAEDADYYC	<u>TSFTITSTV</u>	FGGGTQLTVLG
1-4	GVSNRFGSQSGNTASLTISGLQAEDADYYC	<u>CSYAGSTTWV</u>	FGGGTQLTVLG
7-4	GVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDADYYC	<u>QSYDSSLSAVV</u>	FGGGTKVTVLG
8-1	GVPDRFSGSIDRSSNSASLTISGLKTDEADYYC	<u>QSYDRGVMV</u>	LGGGTKVTVLC
9-1	GVPTRFSGSGSGTEFTLTISNLQDFANYSC	<u>QOSYLTPT</u>	FGGKTKVEIKR
10-1	GIPGRFSGSASGNTASLTITGAQAEDADYYC	<u>NSRDSGGYLVV</u>	FGGGTKLTVLG
10-2	GITDRFSGSRSGDTASLTITGTQADDEADYYC	<u>NSRDTNDNRVL</u>	FGGGTKVTVLG

Fig. 7B

FR-H1		CDR-H1	FR-H2	CDR-H2
1-1	QVQLQQSGPGLVKPSETLSLTCTVS	<u>GYSISSGYWG</u>	WIRQSPGKGLEWIG	<u>SIYRDGITHYNPSLKS</u>
1-2	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCRAS	<u>GGTFSTHAIT</u>	WVRQAPGQGLEWVG	<u>GIIPMYDTANYAQKFQ</u>
1-4	QVQLQESGPRLVRPSQTLSLTCSVS	<u>SDSVTNGNYWT</u>	WIRQHPGKGLEWIG	<u>HIFHNGNTYFNPSLQS</u>
7-4	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAVS	<u>GYSISSDYWG</u>	WIRQPPGKGLECIG	<u>SIYHTGSTYYNPSHKS</u>
8-1	EVQLVESGGGLVKPGESLRRLSCAVS	<u>GFKFSYNIN</u>	WVRQAPGKGLEWVA	<u>SITSFSTHIYYADSLKG</u>
9-1	QVQLQESGSGLVKPSQTLSLTCAVS	<u>GGINSGGYSWS</u>	WIRQPPGKGLEWIG	<u>YIHDSGSTYYNPSLKS</u>
10-1	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS	<u>GYSISSGYQWG</u>	WIRQSPGKGLEWIG	<u>SIYRDGITQYNPSLKS</u>
10-2	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS	<u>GYSISSGYQWG</u>	WIRQSPGKGLEWIG	<u>SIYRDGITQYNPSLKS</u>

FR-H3		CDR-H3	FR-H4
1-1	RVTISVDTSKNQFSLKLTSVTAADTAVYYCAR	<u>AYDFWSGRRPAYYFDY</u>	WGQGLTV
1-2	RVTITADKSTSTAYLELSRLRSED TAVYYCAR	<u>PSNGDWEFEYYGLDV</u>	WGPGLTV
1-4	RLSMSVDKSNQLSLTLSSATAADTAMYYCAS	<u>LDVAVPRHLEH</u>	WGQGLTV
7-4	RVTMSIDTSKNQFSLKLTSVTAADTAVYYCVR	<u>DESLGATPDY</u>	WGQGLTV
8-1	RFTIARDNAGDLVFLQMTSLKAEDTAVYYCAR	<u>EALNWGLYYLDC</u>	GARGTLV
9-1	RVIISVERSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR	<u>GSGYYDSSGYYGGWFDP</u>	WGQGLTV
10-1	RVTISVDTSKNQFSLKLASVTAADTAVYYCAR	<u>AYHFWSGRRPAYYFDF</u>	WGQGLTV
10-2	RVTISVDTSKNQFSLKLASVTAADTAVYYCAR	<u>AYHFWSGRRPAYYFDF</u>	WGQGLTV

-8/13-

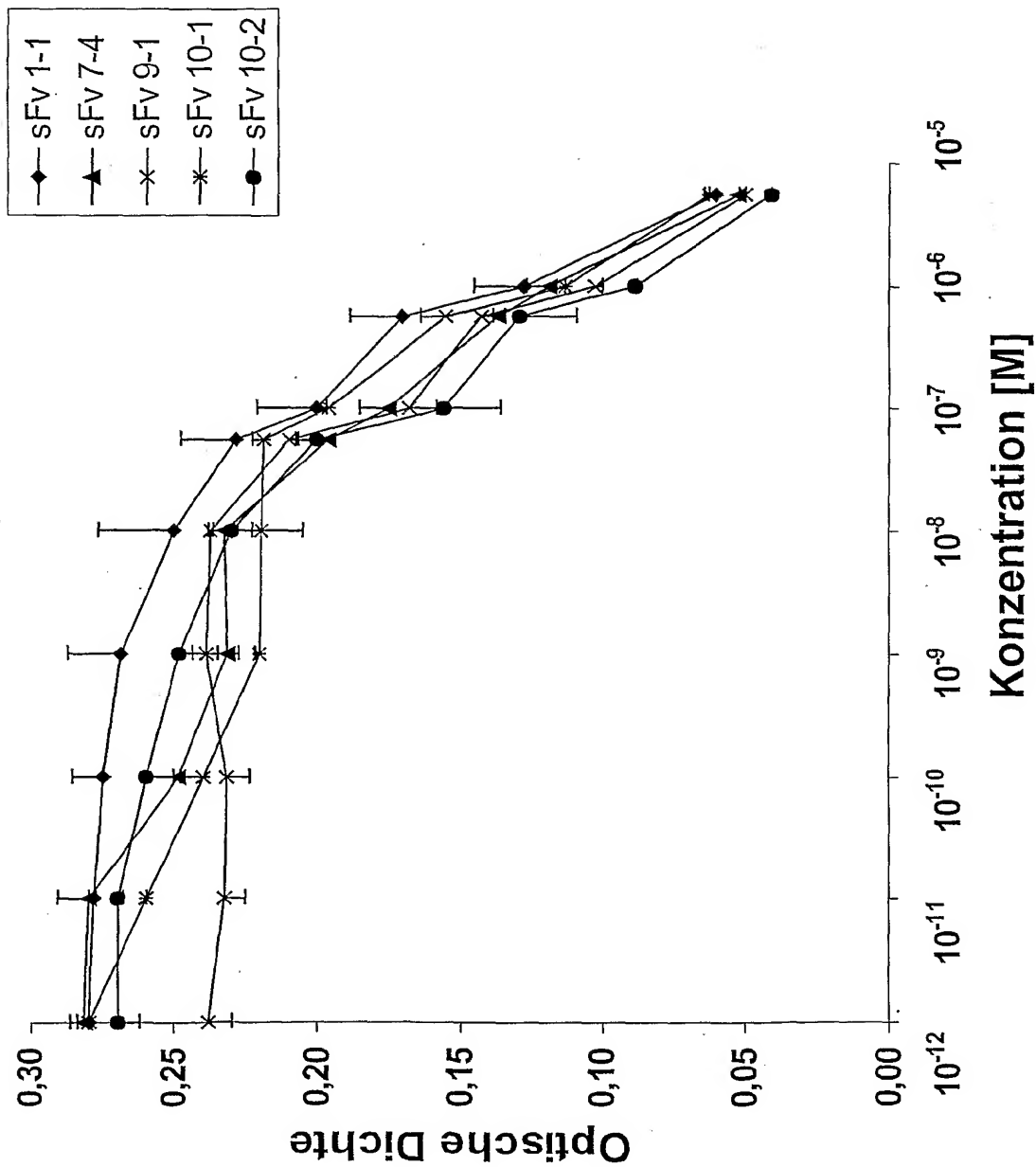


Fig.8

Fig. 9

		-----FR-L1-----	-----CDR-L1-----	-----FR-L2-----
41	MADYKD	EIVLTQSPVTL SLSPGERATL SC	RASQGISS-----FLA	WYQOKPGQAPRL LL TY
44	MADYKD	EIVLTQSPVTL SLSPGERATL SC	RASQGISS-----FLA	WYQOKPGQAPRL LL TY
59	MADYKD	ETITLTQSPATLSVSPGERATLSC	RASQSVRN-----NLA	WYQOKPGQAPRL LL TY
20-0	MADYKD	QSVLTQPP-SASGTPGQ RV TISC	SGSNSNMGS---ISVN	WYQQLPGTAPK LL TY
52	MADYKD	QSVLTQPP-SVSAAPGQ KV TISC	SGGSSNIGS---HYVS	WYQQLPGTAPR LL TY
6	MADYKD	HVILTQPP-SASGTPGQ RV TISC	SGRSNIGSN---TVN	WYQQLPGTAPK LL TY
42	MADYKD	SSELTQDP-AVSVALGQ TV RTIC	QGDSLRRY-----YGS	WYQOKPGQAP LL VVS

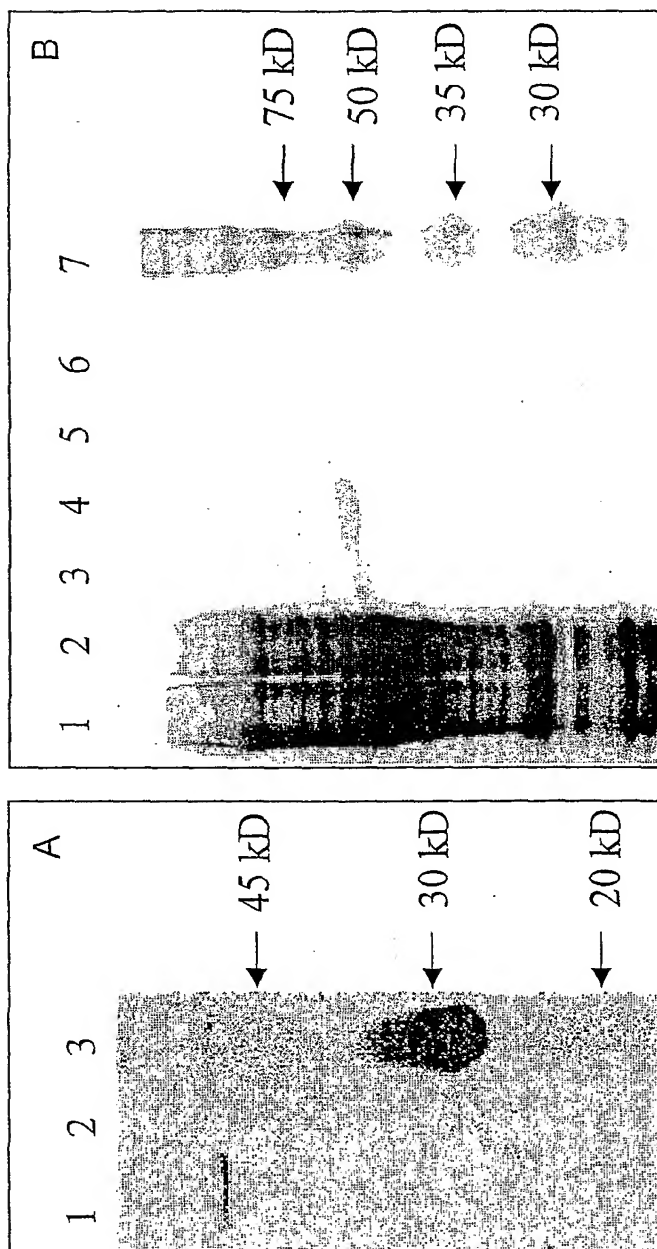
		CDR-L2--	-----FR-L3-----	--CDR-L3--	-----J-----
41	DASIRAT	GIPARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAV YIC	QQR-----	-AFGGG TKVD I	
44	DASIRAT	GIPARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAV YIC	QQR-----	-AFGGG TKVD I	
59	YASTRAT	GIPARFSGSGSGTEFTLT ISSLQSEDFAV YIC	QQYDNWPP--	YTFGQGT TKVD I	
20-0	SNNQRPS	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLQSEDEAD YIC	AAWHDSLNG-	PVFGGG TKLT V	
52	DNSKRPS	GIPDRFSGSKSGTSATL GITGLQTGDEAD YIC	GTWDSSLV-	VVFAGG TKVT V	
6	SNNQRPS	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLQSEDEAD YIC	AAWDDSVSG-	PVFGGG TKLT V	
42	GNNHRPS	GIPDRFSGSSSGNTASLT ITRAQAEDEAD YIC	SSRDRSDNHR	VVFGGG TQLT V	

		-----LINKER-----	-----FR-H1-----	-----CDR-H1-----
41	KR	GGGGSGGGSGGGSGGGGS	QVQLQQSGPGLVKPSQTL SLTCAISGDS SVS	SNSAAWN
44	KR	GGGGSGGGSGGGSGGGGS	QVQLQQSDPGLVKPSQTL SLTCAVYGDR SVS	SNSAAWN
59	KR	GGGGSGGGSGGGSGGGGS	QVQLQESGPGLVKPSQTL SLSCAVSGDS SVS	SKRTAWN
20-0	LG	GGGGSGGGSGGGSGGGGS	EVQLVESGGDLVKPGGSL RSLSCAASGF SFS	--DHNMN
52	LG	GGGGSGGGSGGGSGGGGS	EVQLVESGGGLVQPGGSL RSLSCASGF TFS	--HYPMH
6	LG	GGGGSGGGSGGGSGGGGS	QVQLQESGAEVKKPGSS VKVSCEASG GFEN	--NCPI
42	LG	GGGGSGGGGS	QVQLQESGPGLVKPSETL SLTCTISGYS IS	S-GYYWG

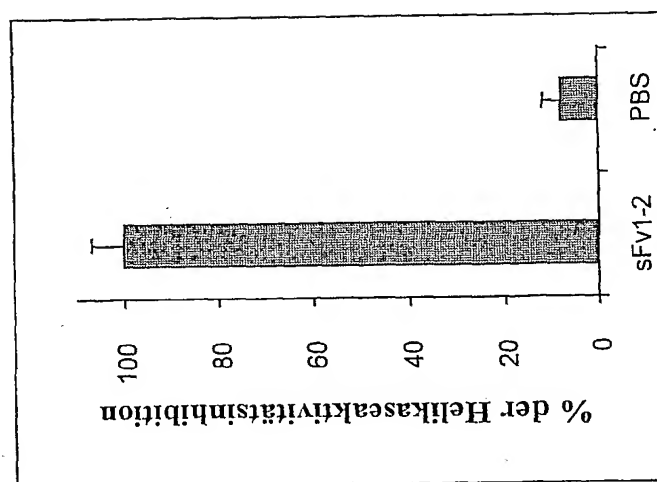
		-----FR-H2-----	-----CDR-H2-----	-----FR-H3-----
41	WIRQSPSRGLEWLG	RTYYRSKWYNGYAVSAKS	RTINPD TAKNQFSLQLNSVTPED TA V YY	
44	WIRQSPSRGLEWLG	RTYYRSKWYNDYAVSVKS	RITINPD TSKNQFSLQLKSVTPED TA V YY	
59	WVRQSPSRGLEWLG	RTYYRSKWNNNYAESVKS	RITINPD TSKNQFSLQLNSVTPDD TA V YY	
20-0	WIRQAPGKGLEWVS	YISSSSS-YTDYADSVKG	RFTISRDN AKNSLYLQMN SLRAEDTA V YY	
52	WVRQAPGKGLEWVS	SISTNGG-STYYADSVKG	RFTISRDN PKNTLFLQMS SLRL ED TA V YY	
6	WVRQAPGQGLEWMG	GVTMSG-TAKYAQKFQ	RLTIVAGKST TTTTYME LS SL RSEDTA V YY	
42	WIRQPPGKGLEWIG	SIYRDG-IT-RYDPSLKS	RVAISVD TSKNQFSLKL SSVTAADTA M YY	

		-----CDR-H3-----
41	CAR	ENMVARDYYG-----MDV.WGQGT LV TVSS
44	CAR	GYSVSWYSSSS-----SYLEY.WGQGT LV TVSS
59	CVG	ARDYDS W SN-----RWSDS.WGQGT LV TVSS
20-0	CAR	GMRSFEVVAAS-----FDY.WGQGT LV TVSS
52	CVK	RGKAWAIFGVP-----YDMDV.WGQGT LV TVSS
6	CTT	RRCAGDY Y VEAP-----YDY.WGQGT LV TVSS
42	CAR	XXXXXXXXXY-----YLDY.WGQGT LV TVSS

Fig. 10



11/13

Fig. 11A

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

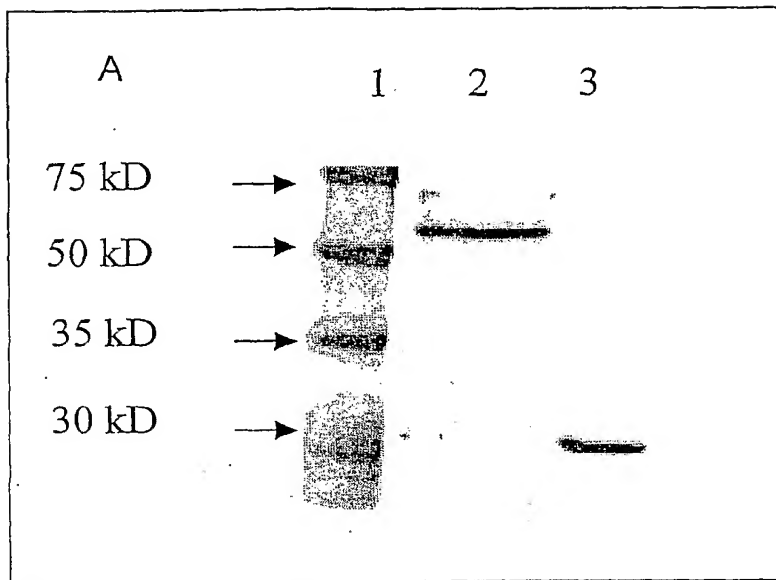
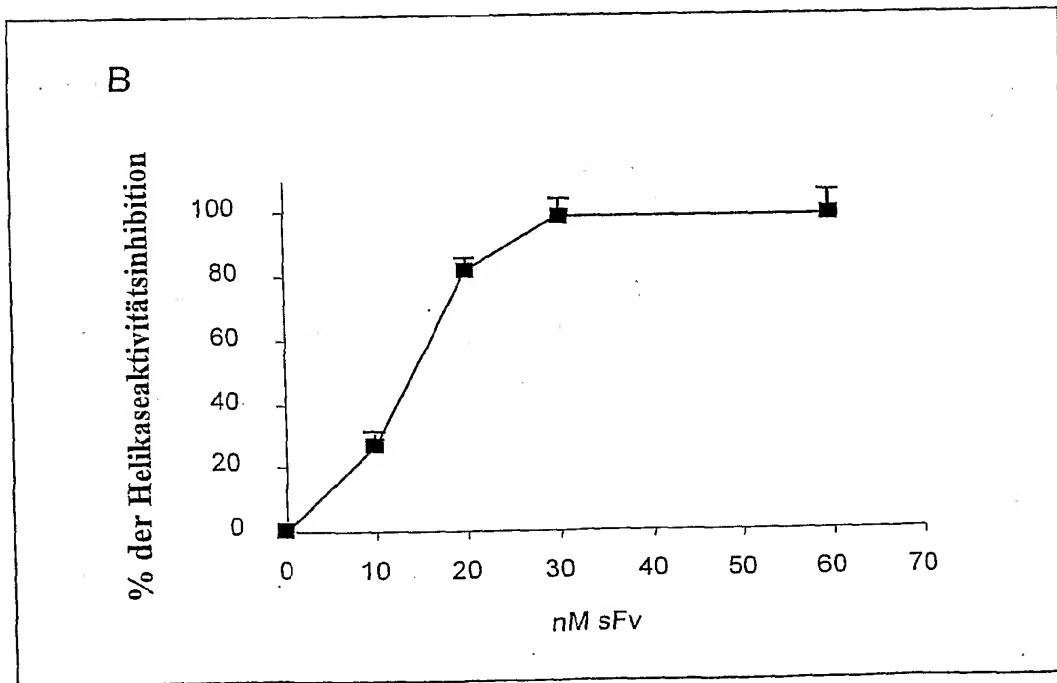
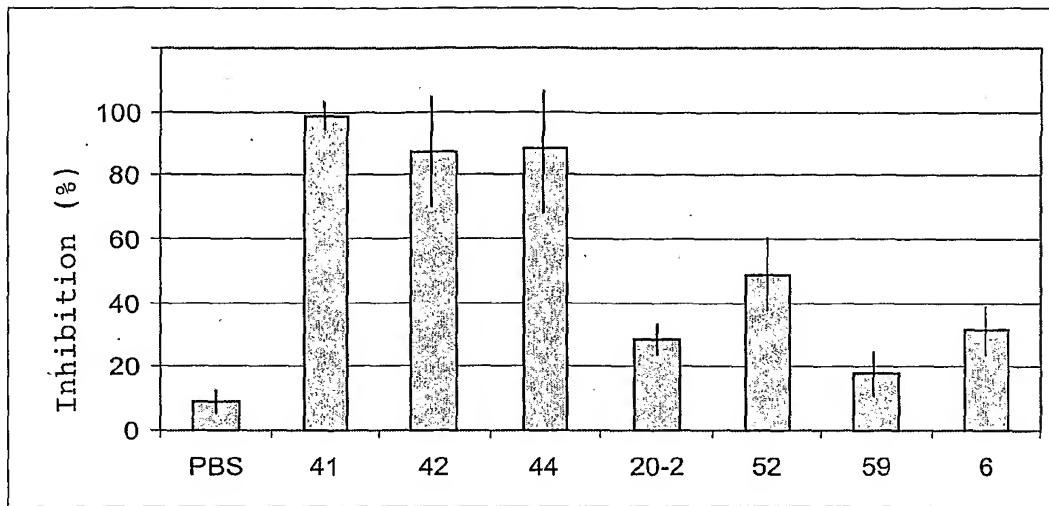
Fig. 11B**Fig. 11C**

Fig. 12

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Heintges, Tobias

<120> Humane hochaffine Antikörperfragmente gegen essentielle Proteine von Hepatitis-C-Virus

<130> 021139wo/JH/ml

<140>

<141>

<160> 68

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 111

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: VL von humanem Antikörper 1-1

<400> 1

His	Val	Ile	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Val	Ser	Glu	Ala	Pro	Gly	Gln
1					5				10					15	
Lys	Ala	Thr	Ile	Ser	Cys	Ser	Gly	Thr	Thr	Ser	Asn	Ile	Gly	Asn	Asn
			20					25					30		
Tyr	Val	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	Val	Pro	Arg	Ala	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu
		35					40					45			
Ile	Tyr	Glu	Gly	Asn	Lys	Arg	Pro	Ser	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser
	50					55					60				
Gly	Ser	Gln	Ser	Gly	Thr	Ser	Ala	Thr	Leu	Gly	Ile	Thr	Gly	Leu	Gln
	65				70					75					80
Thr	Gly	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Val	Ser	Trp	Asp	Ser	Asp	Leu
				85					90					95	
Ser	Ala	Val	Leu	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Gln	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	
			100					105					110		

<210> 2

<211> 111

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: VL von humanem Antikörper 1-2

<400> 2

Gln	Phe	Ala	Leu	Thr	Gln	Pro	Ala	Ala	Val	Ser	Gly	Ser	Pro	Gly	Gln
1					5				10					15	
Ser	Ile	Thr	Ile	Ser	Cys	Ser	Gly	Thr	Ser	Ser	Asp	Phe	His	Gly	His
			20					25					30		

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln His Arg Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Ala Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asp Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Thr Ser Phe Thr Ile Thr
 85 90 95

Ser Thr Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

<210> 3

<211> 111

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: VL von
 humanem Antikörper 1-4

<400> 3

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr
 20 25 30

Asn Leu Val Ala Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Xaa Leu
 35 40 45

Met Ile Tyr Glu Gly Ser Glu Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Gln Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Cys Ser Tyr Ala Gly Ser
 85 90 95

Thr Thr Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

<210> 4

<211> 112

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: VL von
 humanem Antikörper 8-1

<400> 4

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Thr Gly

	20		25		30
Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu	35	40	45		
Leu Val Asn Gly Lys Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe	50	55	60		
Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu	65	70	75	80	
Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser	85	90	95		
Leu Ser Ala Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly	100	105	110		

<210> 5

<211> 111

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: VL von
humanem Antikörper 7-4

<400> 5

Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys	1	5	10	15
Thr Ile Thr Ile Ser Cys Thr Arg Ser Gly Gly Ser Ile Thr Ser Asn	20	25	30	
Phe Val His Trp Tyr Gln Gln Cys Pro Gly Asn Ser Leu Thr Thr Met	35	40	45	
Ile Tyr Asp His His Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser	50	55	60	
Gly Ser Ile Asp Arg Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly	65	70	75	80
Leu Lys Thr Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Arg	85	90	95	
Gly Val Met Val Leu Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Cys	100	105	110	

<210> 6

<211> 106

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: VL von
humanem Antikörper 10-1

<400> 6

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Ile Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Arg Ser Val Arg Thr Ser
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Leu Lys Arg Gly Arg Ala Pro Lys Ala Leu Ile
 35 40 45
 Phe Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Thr Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Leu Gln Asp
 65 70 75 80
 Phe Ala Asn Tyr Ser Cys Gln Gln Ser Tyr Leu Thr Pro Arg Thr Phe
 85 90 95
 Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 7

<211> 109

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: VL von
 humanem Antikörper 10-2

<400> 7

Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Val Lys Ile Thr Cys Gln Gly Asp Asn Leu Arg Ser Ser Ser Ala
 20 25 30
 Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Ile Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 Asn Lys Asp Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Gly Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Ala Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ser Gly Gly Tyr Leu
 85 90 95
 Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105

<210> 8

<211> 109

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: VL von
 humanem Antikörper 9-1

<400> 8

Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
 1 5 10 15

Ile Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Ser Ser Ala
 20 25 30

Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Gln Ala Pro Leu Leu Val Ile Ser
 35 40 45

Asp Asp Asn Thr Arg Pro Ser Gly Ile Thr Asp Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Arg Ser Gly Asp Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Thr Gln Ala Asp
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Thr Asn Asp Asn Arg
 85 90 95

Val Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
 100 105

<210> 9

<211> 121

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: VH von
 humanem Antikörper 1-1

<400> 9

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser Ser Gly
 20 25 30

Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45

Ile Gly Ser Ile Tyr Arg Asp Gly Ile Thr His Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80

Leu Lys Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Ala Tyr Asp Phe Trp Ser Gly Arg Arg Pro Ala Tyr Tyr Phe
 100 105 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 115 120

<210> 10

<211> 121

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: VH von
humanem Antikörper 1-2

<400> 10

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Arg Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Thr His
 20 25 30
 Ala Ile Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Gly Ile Ile Pro Met Tyr Asp Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Pro Ser Asn Gly Asp Trp Glu Phe Glu Tyr Tyr Tyr Gly Leu
 100 105 110
 Asp Val Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val
 115 120

<210> 11

<211> 117

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: VH von
humanem Antikörper 1-4

<400> 11

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Arg Leu Val Arg Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Ser Ser Asp Ser Val Thr Asn Gly
 20 25 30
 Asn Tyr Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Ile Gly His Ile Phe His Asn Gly Asn Thr Tyr Phe Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Gln Ser Arg Leu Ser Met Ser Val Asp Lys Ser Asn Asn Gln Leu
 65 70 75 80
 Ser Leu Thr Leu Ser Ser Ala Thr Ala Ala Asp Thr Ala Met Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Ser Leu Asp Val Ala Val Pro Arg His Leu Glu His Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val
 115

<210> 12
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: VH von
 humanem Antikörper 8-1

<400> 12
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser Ser Asp
 20 25 30
 Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Cys
 35 40 45
 Ile Gly Ser Ile Tyr His Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser His
 50 55 60
 Lys Ser Arg Val Thr Met Ser Ile Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80
 Leu Lys Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Val Arg Asp Glu Ser Leu Gly Ala Thr Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val
 115

<210> 13
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: VH von
 humanem Antikörper 7-4

<400> 13
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Lys Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Asn Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Ser Ile Thr Ser Phe Ser Thr His Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Leu
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ala Arg Asp Asn Ala Gly Asp Leu Val Phe
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Thr Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Glu Ala Leu Asn Trp Gly Leu Tyr Tyr Tyr Leu Asp Cys Gly
 100 105 110

Ala Arg Gly Thr Leu Val
 115

<210> 14

<211> 125

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: VH von
 humanem Antikörper 10-1

<400> 14

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Ser Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Gly Ser Ile Asn Ser Gly
 20 25 30

Gly Tyr Ser Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile His Asp Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Ile Ile Ser Val Glu Arg Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Gly Ser Gly Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr Gly
 100 105 110

Gly Gly Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 115 120 125

<210> 15

<211> 121

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: VH von
 humanem Antikörper 10-2

<400> 15

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser Ser Gly
 20 25 30

Tyr Gln Trp Gly Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45

Ile Gly Ser Ile Tyr Arg Asp Gly Ile Thr Gln Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80

Leu Lys Leu Ala Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ala Tyr His Phe Trp Ser Gly Arg Arg Pro Ala Tyr Tyr Phe
100 105 110

Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
115 120

<210> 16

<211> 121

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: VH von
humanem Antikörper 9-1

<400> 16

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser Ser Gly
20 25 30

Tyr Gln Trp Gly Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Ile Gly Ser Ile Tyr Arg Asp Gly Ile Thr Gln Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80

Leu Lys Leu Ala Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ala Tyr His Phe Trp Ser Gly Arg Arg Pro Ala Tyr Tyr Phe
100 105 110

Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
115 120

<210> 17

<211> 5

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Linkerpeptid

<400> 17

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 18

<211> 528

<212> PRT

<213> Hepatitis C virus

<400> 18

Gly Arg Glu Ile Leu Leu Gly Pro Ala Asp Gly Met Ala Ser Lys Gly
 1 5 10 15

Trp Arg Leu Leu Ala Pro Ile Thr Ala Tyr Ala Gln Gln Thr Arg Gly
 20 25 30

Leu Leu Gly Cys Ile Ile Thr Ser Leu Thr Gly Arg Asp Lys Asn Gln
 35 40 45

Val Glu Gly Glu Val Gln Ile Val Pro Thr Ala Ala Gln Thr Phe Leu
 50 55 60

Ala Thr Cys Ile Asn Gly Val Cys Trp Thr Val Tyr His Gly Ala Gly
 65 70 75 80

Thr Arg Thr Ile Ala Ser Pro Lys Gly Pro Val Ile Gln Met Tyr Ser
 85 90 95

Asn Val Asp Lys Asp Leu Val Gly Trp Pro Ala Pro Gln Gly Ser Arg
 100 105 110

Ser Leu Ala Pro Cys Thr Cys Gly Ser Ser Asp Leu Tyr Leu Val Thr
 115 120 125

Lys His Ala Asp Val Ile Pro Val Arg Arg Arg Gly Asp Ser Arg Gly
 130 135 140

Ser Leu Leu Ser Pro Arg Pro Ile Ser Tyr Leu Lys Gly Ser Ser Gly
 145 150 155 160

Gly Pro Leu Leu Cys Pro Val Gly His Ala Val Gly Ile Phe Arg Ala
 165 170 175

Ala Val Cys Thr Arg Gly Val Ala Lys Ala Ala Asp Phe Ile Pro Val
 180 185 190

Glu Asn Leu Glu Thr Thr Met Arg Ser Pro Val Phe Thr Asp Asn Ser
 195 200 205

Ser Pro Pro Val Val Pro Gln Ser Phe Gln Val Ala His Leu His Ala
 210 215 220

Pro Thr Gly Ser Gly Lys Ser Thr Lys Val Pro Ala Ala Tyr Ala Ala
 225 230 235 240

Gln Gly Tyr Lys Val Leu Val Leu Asn Pro Ser Val Ala Ala Thr Leu
 245 250 255

Gly Phe Gly Ala Tyr Met Ser Lys Ala His Gly Ile Asp Pro Asn Ile
 260 265 270

Arg Thr Gly Val Arg Thr Ile Thr Thr Gly Ser Pro Ile Thr Tyr Ser
 275 280 285

Thr Tyr Gly Lys Phe Leu Ala Asp Gly Gly Cys Ala Gly Gly Ala Tyr
 290 295 300

```

Asp Ile Ile Ile Cys Asp Glu Cys His Ser Thr Asp Ala Thr Ser Ile
305                310                315                320

Leu Gly Ile Gly Thr Val Leu Asp Gln Gly Glu Thr Ala Gly Ala Lys
                325                330                335

Leu Val Val Phe Ala Thr Ala Thr Pro Pro Gly Ser Val Thr Val Pro
                340                345                350

His Pro Asn Ile Glu Glu Val Ala Leu Ser Thr Thr Gly Glu Ile Pro
                355                360                365

Phe Tyr Gly Lys Ala Ile Pro Leu Glu Val Ile Lys Gly Gly Arg His
                370                375                380

Leu Ile Phe Cys His Ser Lys Arg Lys Cys Asp Glu Leu Ala Thr Lys
385                390                395                400

Leu Val Ala Met Gly Ile Asn Ala Val Ala Tyr Tyr Arg Gly Leu Asp
                405                410                415

Val Ser Val Ile Pro Thr Ser Gly Asp Val Val Val Val Ala Thr Asp
                420                425                430

Ala Leu Met Thr Gly Tyr Thr Gly Asp Phe Asp Ser Val Ile Asp Cys
                435                440                445

Asn Thr Cys Val Thr Gln Thr Val Asp Phe Ser Leu Asp Pro Thr Phe
                450                455                460

Thr Ile Glu Thr Thr Thr Leu Pro Gln Asp Ala Val Ser Arg Thr Gln
465                470                475                480

Arg Arg Gly Arg Thr Gly Arg Gly Lys Pro Gly Ile Tyr Arg Phe Val
                485                490                495

Ala Pro Gly Glu Arg Pro Ser Gly Met Phe Asp Ser Ser Val Leu Cys
                500                505                510

Glu Cys Tyr Asp Ala Gly Cys Ala Trp Tyr Glu Leu Thr Pro Ala Glu
                515                520                525

```

<210> 19

<211> 44

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 19

gccatggcgg actacaaaga ccagtctgtg ttgacgcagc cgcc

44

<210> 20

<211> 44

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 20

gccatggcgg actacaaaga ccagtctgcc ctgactcagc ctgc 44

<210> 21

<211> 44

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 21

gccatggcgg actacaaaga ctcttatgtg ctgactcagc cacc 44

<210> 22

<211> 44

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 22

gccatggcgg actacaaaga ctcttctgag ctgactcagg accc 44

<210> 23

<211> 44

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 23

gccatggcgg actacaaaga ccacgttata ctgactcaac cgcc 44

<210> 24

<211> 44

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 24

gccatggcgg actacaaaga ccaggctgtg ctcaactcagc cctc 44

<210> 25

<211> 44

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 25
gccatggcgg actacaaaga caattttatg ctgactcagc ccca 44

<210> 26
<211> 69
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 26
ggagccgccc cgcgcagaac caccaccacc agaaccacca ccaccaccta ggacgggtgac 60
cttgggtccc 69

<210> 27
<211> 66
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 27
ggagccgccc cgcgcagaac caccaccacc agaaccacca ccacctagga cggtcagctt 60
gggtccc 66

<210> 28
<211> 66
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 28
ggagccgccc cgcgcagaac caccaccacc agaaccacca ccacctaaaa cggtgagctg 60
gggtccc 66

<210> 29
<211> 44
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 29
gccatggcgg actacaaaga cgacatccag atgacccagt ctcc 44

<210> 30
<211> 44
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 30
gccatggcgg actacaaaga cgatgttggtg atgactcagt ctcc 44

<210> 31
<211> 44
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 31
gccatggcgg actacaaaga cgaaattgtg atgacgcagt ctcc 44

<210> 32
<211> 44
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 32
gccatggcgg actacaaaga cgacatcgtg ttgacccagt ctcc 44

<210> 33
<211> 44
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 33
gccatggcgg actacaaaga cgaaacgaca ctacgcagt ctcc 44

<210> 34
<211> 44
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 34
gccatggcgg actacaaaga cgaaattgtg ctgactcagt ctcc 44

<210> 35
<211> 69
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 35
ggagccgccg ccgccagaac caccaccacc agaaccacca ccaccacgtt tgatttccac 60

cttgggtccc

69

<210> 36

<211> 69

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 36

ggagccgccg ccgccagaac caccaccacc agaaccacca ccaccacgtt tgatctccag 60
cttgggtccc 69

<210> 37

<211> 69

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 37

ggagccgccg ccgccagaac caccaccacc agaaccacca ccaccacgtt tgatatccac 60
tttgggtccc 69

<210> 38

<211> 69

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 38

ggagccgccg ccgccagaac caccaccacc agaaccacca ccaccacgtt tgatctccac 60
cttgggtccc 69

<210> 39

<211> 69

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 39

ggagccgccg ccgccagaac caccaccacc agaaccacca ccaccacgtt taatctccag 60
tcgtgtccc 69

<210> 40

<211> 53

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 40
ggcggcggcg gctccggtgg tgggtggatcc cagggtgcagc tgggtgcagtc tgg 53

<210> 41
<211> 53
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 41
ggcggcggcg gctccggtgg tgggtggatcc cagggtcaact taagggagtc tgg 53

<210> 42
<211> 53
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 42
ggcggcggcg gctccggtgg tgggtggatcc gaggtgcagc tgggtggagtc tgg 53

<210> 43
<211> 53
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 43
ggcggcggcg gctccggtgg tgggtggatcc cagggtgcagc tgcaggagtc ggg 53

<210> 44
<211> 53
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 44
ggcggcggcg gctccggtgg tgggtggatcc gaggtgcagc tgttgcagtc tgc 53

<210> 45
<211> 53
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 45
ggcggcggcg gctccggtgg tgggtggatcc cagggtacagc tgcagcagtc agg 53

<210> 46
<211> 43
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 46
ggaattcggc ccccgaggcc gaggagacgg tgaccagggt gcc 43

<210> 47
<211> 43
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 47
ggaattcggc ccccgaggcc gaagagacgg tgaccattgt ccc 43

<210> 48
<211> 43
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 48
ggaattcggc ccccgaggcc gaggagacgg tgaccagggt tcc 43

<210> 49
<211> 43
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 49
ggaattcggc ccccgaggcc gaggagacgg tgaccgtggt ccc 43

<210> 50
<211> 17
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 50
ggaattcggc ccccgag 17

<210> 51
<211> 37

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 51

ttactcgcgg cccagccggc catggcggac tacaaag

37

<210> 52

<211> 254

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: sFv

Antikörperfragment von Klon 41

<400> 52

Met Ala Asp Tyr Lys Asp Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Val Thr
1 5 10 15

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser
20 25 30

Gln Gly Ile Ser Ser Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Ile Arg Ala Thr Gly Ile
50 55 60

Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Arg Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Gly Gly Gly
100 105 110

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
130 135 140

Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser
145 150 155 160

Asn Ser Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu
165 170 175

Glu Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Gly Tyr
180 185 190

Ala Val Ser Ala Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ala Lys
195 200 205

Asn Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala
210 215 220

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Asn Met Val Ala Arg Asp Tyr Tyr Gly

225											230											235											240
Met	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser																				
				245											250																		
<210> 53																																	
<211> 257																																	
<212> PRT																																	
<213> Künstliche Sequenz																																	
<220>																																	
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: sFv																																	
Antikörperfragment von Klon 44																																	
<400> 53																																	
Met	Ala	Asp	Tyr	Lys	Asp	Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Val	Thr																		
1				5					10											15													
Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser																		
			20					25											30														
Gln	Gly	Ile	Ser	Ser	Phe	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln																		
			35					40											45														
Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Asp	Ala	Ser	Ile	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile																		
			50					55											60														
Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr																		
			65					70											75			80											
Ile	Ser	Ser	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln																		
			85					90											95														
Arg	Ala	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Asp	Ile	Lys	Arg	Gly	Gly	Gly																		
			100					105											110														
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly																		
			115					120											125														
Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Asp	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser																		
			130					135											140														
Gln	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ala	Val	Tyr	Gly	Asp	Arg	Val	Ser	Ser																		
			145					150											155			160											
Asn	Ser	Ala	Ala	Trp	Asn	Trp	Ile	Arg	Gln	Ser	Pro	Ser	Arg	Gly	Leu																		
			165					170											175														
Glu	Trp	Leu	Gly	Arg	Thr	Tyr	Tyr	Arg	Ser	Lys	Trp	Tyr	Asn	Asp	Tyr																		
			180					185											190														
Ala	Val	Ser	Val	Lys	Ser	Arg	Ile	Thr	Ile	Asn	Pro	Asp	Thr	Ser	Lys																		
			195					200											205														
Asn	Gln	Phe	Ser	Leu	Gln	Leu	Lys	Ser	Val	Thr	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala																		
			210					215											220														
Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Gly	Tyr	Ser	Val	Ser	Trp	Tyr	Ser	Ser	Ser																		
			225					230											235			240											
Ser	Ser	Tyr	Leu	Glu	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser																		
			245					250											255														

Ser

<210> 54

<211> 262

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: sFv
Antikörperfragment von Klon 59

<400> 54

```

Met Ala Asp Tyr Lys Asp Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr
  1              5              10              15

Leu Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser
      20              25              30

Gln Ser Val Arg Asn Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
      35              40              45

Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile
      50              55              60

Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr
      65              70              75              80

Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
      85              90              95

Tyr Asp Asn Trp Pro Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Asp
      100              105              110

Ile Lys Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
      115              120              125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro
      130              135              140

Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Ser Cys Ala Val Ser
      145              150              155              160

Gly Asp Ser Val Ser Ser Lys Arg Thr Ala Trp Asn Trp Val Arg Gln
      165              170              175

Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser
      180              185              190

Lys Trp Asn Asn Asn Tyr Ala Glu Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile
      195              200              205

Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val
      210              215              220

Thr Pro Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Gly Ala Arg Asp Tyr
      225              230              235              240

Asp Ser Asp Trp Ser Asn Arg Trp Ser Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr
      245              250              255

```

Leu Val Thr Val Ser Ser
260

<210> 55

<211> 261

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: sFv
Antikörperfragment von Klon 20-0

<400> 55

Met Ala Asp Tyr Lys Asp Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala
1 5 10 15

Ser Gly Thr Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Asn
20 25 30

Ser Asn Met Gly Ser Ile Ser Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly
35 40 45

Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly
50 55 60

Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Ala	Ser	Leu
65					70					75					80

Ala Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Ala Trp His Asp Ser Leu Asn Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys
100 105 110

Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
130 135 140

Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
145 150 155 160

Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Asp His Asn Met Asn Trp Ile Arg Gln
165 170 175

Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Ser
180 185 190

Ser Tyr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
195 200 205

Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
210 215 220

Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Met Arg Ser Phe
225 230 235 240

Glu Val Val Val Ala Ala Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
245 250 255

Val Thr Val Ser Ser

260

<210> 56

<211> 262

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: sFv
Antikörperfragment von Klon 52

<400> 56

```

Met Ala Asp Tyr Lys Asp Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val
  1             5             10             15

Ser Ala Ala Pro Gly Gln Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Gly Ser
      20             25             30

Ser Asn Ile Gly Ser His Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly
      35             40             45

Thr Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Asn Ser Lys Arg Pro Ser Gly
      50             55             60

Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu
      65             70             75             80

Gly Ile Thr Gly Leu Gln Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly
      85             90             95

Thr Trp Asp Ser Ser Leu Ser Val Val Val Phe Ala Gly Gly Thr Lys
      100            105            110

Val Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
      115            120            125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
      130            135            140

Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser
      145            150            155            160

Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser His Tyr Pro Met His Trp Val Arg Gln
      165            170            175

Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Val Ser Ser Ile Ser Thr Asn Gly
      180            185            190

Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
      195            200            205

Arg Asp Asn Pro Lys Asn Thr Leu Phe Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg
      210            215            220

Leu Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Lys Arg Gly Lys Ala Trp
      225            230            235            240

Ala Ile Phe Gly Val Pro Tyr Asp Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
      245            250            255

Leu Val Thr Val Ser Ser
      260

```


<210> 57

<211> 261

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: sFv
Antikörperfragment von Klon 6

<400> 57

```

Met Ala Asp Tyr Lys Asp His Val Ile Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala
  1              5              10              15

Ser Gly Thr Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Arg
      20              25              30

Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly
      35              40              45

Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly
      50              55              60

Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu
      65              70              75              80

Ala Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala
      85              90              95

Ala Trp Asp Asp Ser Val Ser Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys
      100             105             110

Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
      115             120             125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser
      130             135             140

Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Glu
      145             150             155             160

Ala Ser Gly Gly Thr Phe Asn Asn Cys Pro Ile Ser Trp Val Arg Gln
      165             170             175

Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Gly Val Thr Pro Met Ser
      180             185             190

Gly Thr Ala Lys Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Leu Thr Ile Val
      195             200             205

Ala Gly Lys Ser Thr Thr Thr Thr Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg
      210             215             220

Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Thr Arg Arg Cys Ala Gly
      225             230             235             240

Asp Tyr Tyr Val Glu Ala Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
      245             250             255

Val Thr Val Ser Ser
      260

```

<210> 58

<211> 249

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: sFv
Antikörperfragment von Klon 42

<400> 58

```

Met Ala Asp Tyr Lys Asp Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val
 1             5             10             15

Ser Val Ala Leu Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser
      20             25             30

Leu Arg Arg Tyr Tyr Gly Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
      35             40             45

Pro Leu Leu Val Val Ser Gly Asn Asn His Arg Pro Ser Gly Ile Pro
      50             55             60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile
      65             70             75             80

Thr Arg Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Arg
      85             90             95

Asp Arg Ser Asp Asn His Arg Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu
      100            105            110

Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val
      115            120            125

Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu
      130            135            140

Ser Leu Thr Cys Thr Ile Ser Gly Tyr Ser Ile Ser Ser Gly Tyr Tyr
      145            150            155            160

Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
      165            170            175

Ser Ile Tyr Arg Asp Gly Ile Thr Arg Tyr Asp Pro Ser Leu Lys Ser
      180            185            190

Arg Val Ala Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
      195            200            205

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg
      210            215            220

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly
      225            230            235            240

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
      245

```

<210> 59

<211> 762

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA
codierend für sFv 41 Antikörperfragment

<400> 59

```
atggcgggact acaaagacga aattgtgttg acgcagtctc cagtcaccct gtctttgtct 60
ccaggggaaa gagccaccct ctccctgcagg gccagtcagg gtataagcag cttcttagcc 120
tggtaccaac agaaacctgg ccaggctccc aggtcctca tctatgatgc atccattagg 180
gccactggca tcccagccag gttcagtggc agtgggtctg ggacagactt cactctcacc 240
atcagcagcc tagagcctga agattttgca gtttattact gtcagcagcg ggctttcggc 300
ggagggacca aagtggatat caaacgtggg ggtgggtggt ctgggtgggtg tggttctggc 360
ggcggcggct ccggtgggtg tggatcccag gtacagctgc agcagtcagg tccaggactg 420
gtgaagccct cgcagaccct ctcaactcacc tgtgccatct ccggggacag tgtctctagc 480
aacagtgtctg cttggaactg gatcaggcag tccccatcga gaggccttga gtggctggga 540
aggacatact acaggtccaa gtggtataat ggttatgcag tatctgcgaa aagtcgaata 600
actatcaacc cagacacagc caagaaccag ttctccctgc agctgaactc tgtgactccc 660
gaggacacgg ctgtgtatta ctgtgcacga gaaaacatgg tggccaggga ctactacggg 720
atggacgtct ggggccaagg caccctgggc accgtctcct cg 762
```

<210> 60

<211> 771

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA
codierend für sFv 44 Antikörperfragment

<400> 60

```
atggcgggact acaaagacga aattgtgttg acgcagtctc cagtcaccct gtctttgtct 60
ccaggggaaa gagccaccct ctccctgcagg gccagtcagg gtataagcag cttcttagcc 120
tggtaccaac agaaacctgg ccaggctccc aggtcctca tctatgatgc atccattagg 180
gccactggca tcccagccag gttcagtggc agtgggtctg ggacagactt cactctcacc 240
atcagcagcc tagagcctga agattttgca gtttattact gtcagcagcg ggctttcggc 300
ggagggacca aagtggatat caaacgtggg ggtgggtggt ctgggtgggtg tggttctggc 360
ggcggcggct ccggtgggtg tggatcccag gtacagctgc agcagtcaga tccaggactg 420
gtgaagccct cgcagaccct ctcaactcacc tgtgccgtct acggggaccg tgtctccagc 480
aacagtgtctg cttggaactg gatcaggcag tccccatcga gaggccttga gtggctggga 540
aggacatact acaggtctaa gtggtataat gattatgcag tatctgtgaa aagccgaata 600
accatcaacc cagacacatc caagaaccag ttctccctgc agttgaaatc tgtgactccc 660
gaggacacgg ctgtgtatta ctgtgcaaga ggctactcag tatcctggta tagcagttcg 720
tcaagctacc ttgaatattg gggccagggc accctgggtca ccgtctctc g 771
```

<210> 61

<211> 786

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA
codierend für sFv 59 Antikörperfragment

<400> 61

```
atggcgggact acaaagacga aacgacactc acgcagtctc cagccaccct gtctgtgtct 60
ccaggggaaa gggccaccct ctccctgcagg gccagtcaga gtgttaggaa caatttagcc 120
tggtatcagc agaaacctgg ccaggctccc aggtcctca tctattatgc gtccaccagg 180
gccacaggtg tcccagccag gttcagtggc agtgggtctg ggacagagtt cactctcacc 240
atcagcagcc tgcagtctga ggattttgca gtttattact gtcagcagta cgataactgg 300
cctccgtaca cttttggcca ggggacaaaa gtggatatca aacgtgggtg tgggtggttct 360
```

```

ggtggtggtg gttcaggcgg cggcggctcc ggtggtggtg gatcccaggt gcagctgcag 420
gagtcggggc caggactggt gaagccctcg cagaccctct cactctcctg tgccgtctcc 480
ggggacagtg tctcgagtaa aaggactgct tgggaattggg tcaggcagtc cccatcgaga 540
ggccttgagt ggctgggaag gacatactac aggtccaagt ggaataataa ttatgcagaa 600
tctgtgaaaa gtcgaataac catcaacca gacacatcca agaaccagtt ctccctgcag 660
ctgaactctg tgactcccga cgacacggct gtatattact gtgtaggagc aagagattat 720
gacagtgact ggtcaaactg ttggtccgac tcctggggcc agggcaccct ggtcaccgtc 780
tcctcg

```

<210> 62

<211> 723

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA
codierend für sFv 20-0 Antikörperfragment

<400> 62

```

atggcgggact acaaagacca gtctgtgttg acgcagccgc cctcagcgtc tgggaccccc 60
gggcagagggg tcaccatctc ttgttctgga agcaactcca acatgggaag tattagtgtg 120
aactggtacc agcagctccc aggaacggcc cccaaactcc tcacttatag taataatcag 180
cgccctcag gggctccctga ccgattctct ggctccaagt ctggcacctc agcctctgac 240
agcctgaatg gtccggtgtt cggcggaggg accaagctga ccgtcctagg tgggtggtggt 300
ggttctggtg gtggtggttc tggcggcggc ggctccggtg gtggtggatc cgaggtgcag 360
ctggtggagt ctgggggaga cttggtcaag cctggagggt ccctgagact ctctgtgca 420
gcctctggat tcagcttcag tgaccacaac atgaactgga ttcgccaggc tccaggggaag 480
gggtctggagt gggtttcata cattagtagt agtagtagt acacagacta cgcagactct 540
gtgaaggggc gattcaccat ctccagagac aacgccaaga actcactgta tctgcaaatg 600
aacagcctga gagccgagga cacggctgtg tattactgtg cgagagggat gaggtccttt 660
gaagtgggtg tagctgcctc ctttgactat tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 720
tcg

```

<210> 63

<211> 786

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA
codierend für sFv 52 Antikörperfragment

<400> 63

```

atggcgggact acaaagacca gtctgtgttg acgcagccgc cctcagtgct tgcggcccct 60
ggacagaagg tcaccatctc ctgctctgga ggcagctcca acattgggag tcattatgtc 120
tcgtggtacc agcaactccc aggaacagcc ccagactcc tcatttatga caattctaag 180
cgaccctcag ggattcctga ccgattctct ggctccaagt ctggcacgtc agccaccctg 240
ggcatcaccg gactccagac tggggacgag gccgattatt actgcggcac atgggacagc 300
agcctgagtg ttgtggtatt cgccggaggg accaaggtca ccgtcctagg tgggtggtggt 360
ggttctggtg gtggtggttc tggcggcggc ggctccggtg gtggtggatc cgaggtgcag 420
ctggtggagt ctgggggagg cttggtccag cctgggggggt cgctgagact ctctgttca 480
gcctctggat tcaccttcag tcactatcct atgcactggg tccgccaggc tccaggggaag 540
ggactggaat atgtttcatc tatcagtact aatgggggca gcacatacta cgcagactcc 600
gtgaagggca gattcaccat ctccagagac aatcccaaga acacgctgtt tcttcaaatg 660
agcagtctga gacttgaaga cacggctgtc tattattgtg tgaaaagagg gaaagcgtgg 720
gctatctttg gagtgcctta cgacatggac gtctggggcc aaggcaccct ggtcaccgtc 780
tcctcg

```

<210> 64

<211> 783

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA
codierend für sFv 6 Antikörperfragment

<400> 64

```

atggcggact acaaagacca cgttatactg actcaaccgc cctcagcgtc tgggaccccc 60
gggcagaggg tcaccatctc ttgttctgga agcaggtcca acatcggaag taataactgta 120
aactggtacc agcagctccc aggaacggcc cccaaactcc tcacttatag taataatcag 180
cggccctcag gggtccctga ccgattctct ggctccaagt ctggcacctc agcctccctg 240
gccatcagtg gggtccagtc tgaggatgag gctgattatt actgtgcagc atgggatgac 300
agtgtgagtg gtccggtgtt cggcggaggg accaagctga ccgtcctagg tgggtggtgg 360
ggttctggtg gtggtggttc tggcggcggc gggtccggtg gtggtggatc ccagggtgcag 420
ctgcaggagt cgggggctga ggtaaagaag cctgggtcct cggatgaagg ctctgctgag 480
gcctctggag gcaccttcaa caactgtcct atcagctggg ttcgacaggc ccctggacaa 540
ggacttgaat ggatgggagg agtcacccct atgtctggga cagcaaagta cgctcagaag 600
ttccagggca ggctcacgat tgtcgcgggc aaatctacga ccacaacgta catggagctg 660
agcagcctga gatctgagga caccggcgtg tattactgta cgacccgacg ctgtgctgga 720
gactactatg tggaggcccc ctatgactat tggggccagg gcaccctggg caccgtctcc 780
tcg

```

<210> 65

<211> 678

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA
codierend für sFv 42 Antikörperfragment

<400> 65

```

atggcggact acaaagactc ttctgagctg actcaggacc ctgctgtgtc tgtggccttg 60
ggacagacag tcaggatcac atgccaagga gacagcctca gaaggtatta tgggaagctgg 120
taccagcaga agccaggaca ggccccctcta cttgtcgtct ctgggaacaa ccaccggccc 180
tcagggatcc cagaccgatt ctctggctcc agttcaggaa acacagcttc gttgaccatc 240
actcgggctc aggcggaaga tgaggctgac tattactgta gctcccgga cagaagtgat 300
aaccatcggg tggttttcgg cggagggacc cagctcaccg ttttaggtgg cggcggcggc 360
tccggtggtg gtggatccca ggtgcagctg caggagtccg gccaggact ggtgaagcct 420
tcggagaccc tgtccctcac ctgcactatc tctggttact ccatcagcag tggttactac 480
tggggctgga tccggcagcc cccagggaag gggctggagt ggattgggag tatttatcgt 540
gatgggatca ccttctccct gaagctgagc tctgtgaccg ccgcagacac cgcaatgtat 600
tactgtgcga gannnnnnnn nnnnnnnnnn tactacttgg actactgggg ccagggcacc 660
ctggtcaccg tctcctcg

```

<210> 66

<211> 60

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 66

```

ggtttaaaaa ataggaggga caacgtcgtg actgggaaaa ctccccgggt accgagctcg 60

```

<210> 67

<211> 22

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 67

gttttcccag tcacgacgtt gt

22

<210> 68

<211> 22

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 68

acaacgtcgt gactgggaaa ac

22